



FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

GRADO EN MEDICINA

## TRABAJO FIN DE GRADO

**Nanosistemas en diagnosis y tratamiento de la  
enfermedad de Alzheimer.**

Nanosystems in diagnosis and treatment of  
Alzheimer's disease.

**Autor:** D. Alberto Martínez Arribas

**Director:** Dr. Íñigo Casafont Parra

**Santander, Junio 2019**

# ÍNDICE

Resumen .....	2
Abstract .....	2
1. Introducción y antecedentes.....	3
1.1 Definción y epidemiología .....	3
1.2 Neurobiología .....	4
1.3 Limitaciones de la terapéutica actual .....	10
1.4 Limitaciones en el diagnóstico actual.....	12
1.5 La barrera hematoencefálica .....	13
1.6 Nanomedicina .....	18
2. Objetivos .....	24
3. Metodología.....	25
4. Resultados y discusión.....	26
4.1 Introducción a las nanopartículas .....	26
4.2 Nanopartículas poliméricas.....	28
4.3 Nanopartículas lipídicas sólidas.....	32
4.4 Liposomas .....	33
4.5 Nanopartículas de oro.....	36
4.6 Otros .....	38
4.6.1 Terapia quelante .....	38
4.6.2 Ácido nucleico de glicerol.....	39
4.6.3 Nanogeles .....	39
5. Conclusiones .....	40
6. Agradecimientos.....	41
7. Bibliografía .....	42

## RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer afecta a más de 30 millones de personas a nivel mundial y se espera que su prevalencia aumente hasta más de 100 millones en 30 años. Sin embargo, para una enfermedad tan prevalente disponemos de unos métodos de diagnóstico poco específicos y tardíos y de un tratamiento que no consigue alcanzar el cerebro en buenas concentraciones y que es solo sintomático, sin ser capaz de parar la progresión de la enfermedad. Los nanosistemas, y en especial las nanopartículas, ofrecen una gran mejora en el manejo del Alzheimer. Gracias a ellas podemos cruzar la barrera hematoencefálica, el gran obstáculo para la actuación de la medicación, y lograr una concentración adecuada de los fármacos en el cerebro, tanto de los actuales, como de otros nuevos que se usarán en paralelo con las nanopartículas. En cuanto al diagnóstico, las nanopartículas hacen que este sea mucho más preciso y temprano. En conclusión, las nanopartículas ofrecen una gran mejora tanto en el tratamiento como en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer.

## ABSTRACT

Alzheimer's disease affects more than 30 million people worldwide and it is expected that its prevalence increases to more than 100 million in 30 years. However, for such a prevalent disease we have some non-specific and late diagnostic methods and a treatment that can not reach the brain in good concentrations and that is only symptomatic without being able to stop the progression of the disease. Nanosystems, and especially nanoparticles, offer a great improvement in the management of Alzheimer's. Thanks to them, we can cross the blood-brain barrier, the great obstacle to the action of the medication, and achieve an adequate concentration of the drugs in the brain, both of the current ones and of new ones that will be used in parallel with the nanoparticles. In terms of diagnosis, nanoparticles make it much more accurate and early. In conclusion, nanoparticles offer a great improvement both in the treatment and in the diagnosis of Alzheimer's disease.

## PALABRAS CLAVE

Enfermedad de Alzheimer, nanosistema, nanopartícula, nanomedicina, barrera hematoencefálica.

# 1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

## 1.1 DEFINICIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA

La enfermedad de Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa que se caracteriza, a nivel histológico, por la presencia cerebral de ovillos neurofibrilares y placas de amiloide, elevados niveles de estrés oxidativo y neuroinflamación y por los niveles reducidos de acetilcolina. En sus fases iniciales se distingue principalmente por la disminución en la memoria reciente. En las fases más tardías la enfermedad se caracteriza por una disminución tan profunda en las funciones cognitivas que las personas que sufren esta enfermedad pierden sus habilidades, intereses y capacidades para llevar a cabo por sí mismos las actividades de la vida diaria como bañarse, vestirse o comer. Mucho antes de que una persona llegue a esta fase final de la enfermedad, no podrá reconocer a sus hijos, su pareja y sus seres queridos. Además, perderá la personalidad que le ha caracterizado como individuo. Estas pérdidas junto con la aparición de otros problemas de comportamiento tales como conductas violentas, depresión, delirio, psicosis y pérdida del juicio y las habilidades sociales hace que muchas personas con enfermedad de Alzheimer pasen los últimos años de su vida en un centro institucionalizado alejados de sus allegados. (1)

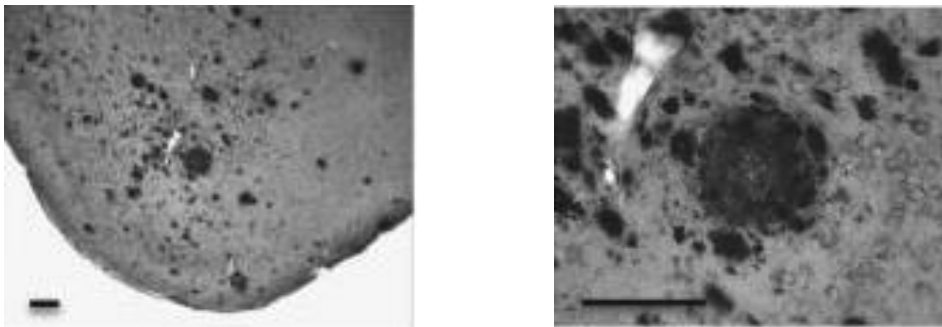
La enfermedad de Alzheimer está considerada como una epidemia y se estimaba que afectaba a 36 millones de personas a nivel mundial en el año 2016. (2) La incidencia de la enfermedad aumenta con la edad, pasando de una prevalencia de un 12% a la edad de 90 años a una prevalencia de un 40% en aquellos con 100 años o más. (1) En Estados Unidos se estimaba en el año 2016 que la prevalencia de la enfermedad de Alzheimer a cualquier edad es de 5,4 millones. Esta enfermedad es la sexta causa principal de muerte en Estados Unidos y la quinta causa principal de muerte si solo contabilizamos las defunciones de los mayores de 65 años. Las muertes por la enfermedad de Alzheimer han aumentado un 71% entre el año 2000 y el año 2013, mientras que las muertes por infarto, enfermedad cardíaca y cáncer de próstata han disminuido un 23%, un 14% y un 11% respectivamente. (2) Existen distintos factores que incrementan el riesgo de sufrir Alzheimer como son la obesidad, diabetes mellitus, hipertensión, enfermedad renal y antecedentes de trauma cerebral, consumo de tabaco o depresión. Dado que la prevalencia de estos factores está aumentando, la incidencia de Alzheimer se prevé que aumentará de la misma manera. (1) Así, se estima que el número de pacientes con enfermedad de Alzheimer se eleve hasta los 10 millones en 2050 en Estados Unidos (3) y hasta los 115 millones de pacientes a nivel mundial. (2)

En España, según el Instituto Nacional de Estadística y con datos de 2014, la enfermedad de Alzheimer ha sido la séptima causa de muerte más habitual con 14.022 fallecidos. Cabe destacar la sobremortalidad femenina en esta enfermedad, ya que hubo 9.923 defunciones de mujeres por 4.099 defunciones de hombres, es decir, de cada diez fallecidos, siete fueron mujeres. (4)

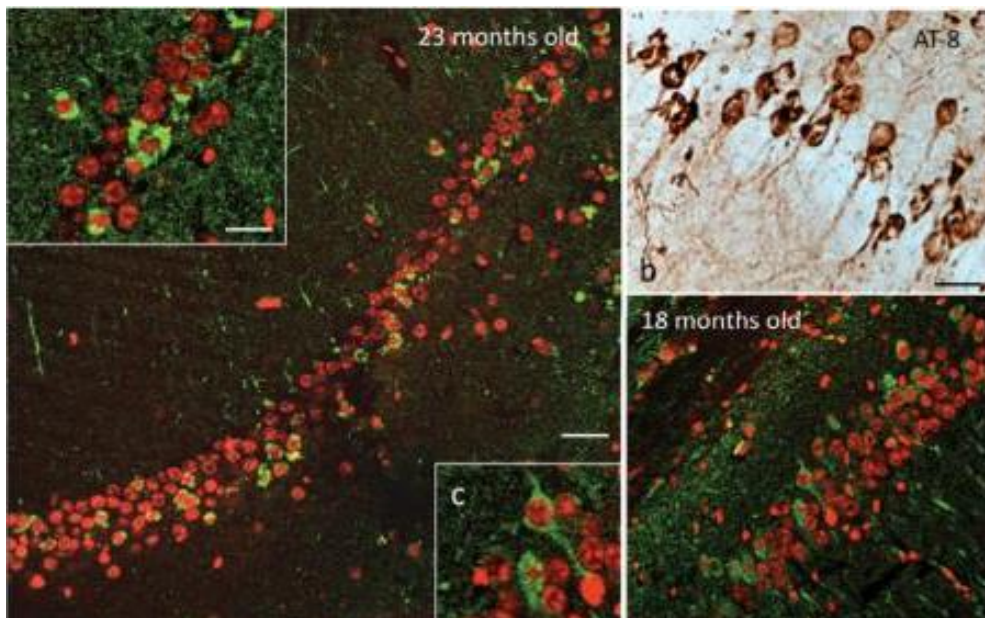
## 1.2 NEUROBIOLOGÍA

Los dos hallazgos patológicos que se requieren para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer son el depósito extracelular de placas del péptido beta-amiloide (figura 1) y los ovillos neurofibrilares de la proteína de unión de microtúbulos Tau (figura 2). (5)

Las placas cargadas de péptido beta-amiloide y neuritas distróficas en los campos neocorticales terminales, así como ovillos neurofibrilares en las estructuras mediales del lóbulo temporal son los hallazgos patológicos más importantes de la enfermedad de Alzheimer. Además, la pérdida de neuronas y de sustancia blanca, la desregulación en algunos neurotransmisores, la inflamación a nivel cerebral y el daño oxidativo también están presentes.



**Figura 1:** Inmunohistoquímica de secciones cerebrales de un ratón con enfermedad de Alzheimer inducida usando un anticuerpo monoclonal contra el péptido beta-amiloide. Barra escala: 100  $\mu$ m. (6)



**Figura 2:** Inmunofluorescencia mostrando ovillos neurofibrilares de proteína Tau en células del hipocampo de ratones con enfermedad de Alzheimer inducida. (7)

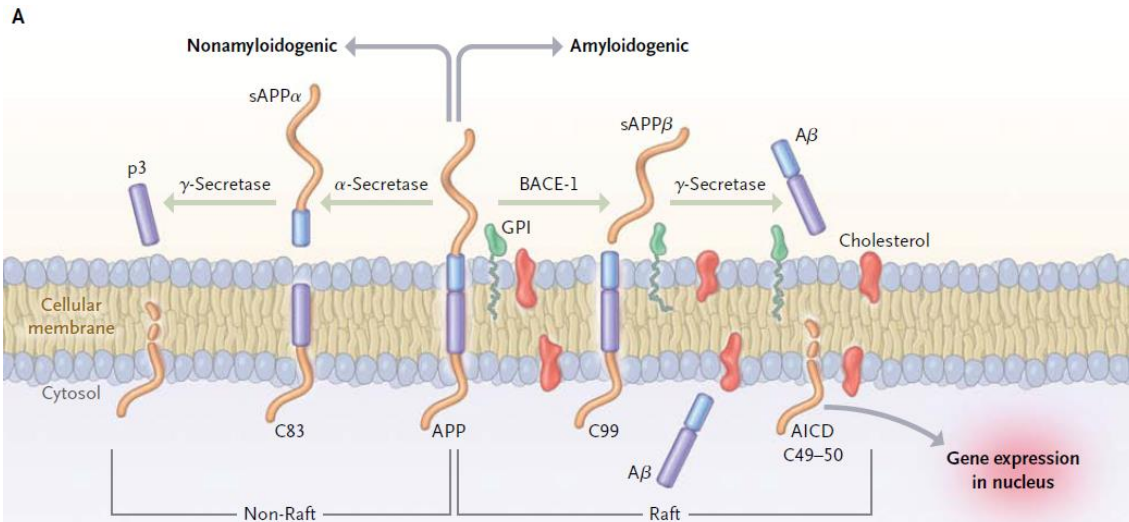
El péptido beta-amiloide (figura 3) es un producto natural del metabolismo que consiste en un péptido compuesto por 36 a 43 aminoácidos. Los monómeros de péptido beta-amiloide 40 son mucho más frecuentes que las especies péptido beta-amiloide 42, que son propensas a la agregación y resultan dañinas y

tóxicas. Los péptidos beta-amiloide se originan a partir de la proteólisis de la proteína precursora de amiloide por la acción de la enzima beta-secretasa (también llamada BACE-1 o Memapsina 2). Un desequilibrio entre la producción, la eliminación y la agregación de péptidos, hace que se acumule péptido beta-amiloide, y este exceso de péptido puede ser el factor que marque el inicio de la enfermedad de Alzheimer. Esta teoría, llamada "hipótesis amiloide", se basa en estudios de formas hereditarias de la enfermedad de Alzheimer. El péptido beta-amiloide se agrega de forma espontánea en múltiples formas físicas distintas que coexisten dentro de una misma patología como la enfermedad de Alzheimer. Una de estas formas consiste en oligómeros (2 a 6 péptidos), que se unen en formas de amiloide intermedios. El péptido beta-amiloide también puede crecer en fibrillas, que se organizan en láminas beta plegadas para formar las fibras insolubles de las placas de amiloide avanzadas. Los oligómeros solubles y los amiloide intermedios son las formas más neurotóxicas del péptido beta-amiloide. Puede observarse, en las preparaciones de cortes cerebrales, que los dímeros y trímeros de péptido beta-amiloide son tóxicos para las sinapsis neuronales. Podemos decir también que la gravedad del defecto cognitivo en la enfermedad de Alzheimer se correlaciona con los niveles de oligómeros de péptidos en el cerebro, no con la carga total de péptido beta-amiloide en el organismo.

Las proteasas neprilisina y la enzima degradadora de la insulina regulan los niveles de péptido beta-amiloide. La neprilisina, una endopeptidasa de zinc anclada a la membrana neuronal, degrada los monómeros y oligómeros de péptido beta-amiloide. Una reducción en la concentración de esta endopeptidasa, la neprilisina, provoca la acumulación de péptido beta-amiloide cerebral. (8) La enzima degradadora de insulina, una tiol metaloendopeptidasa, degrada pequeños péptidos como la insulina y el péptido beta-amiloide monomérico. (9) En los ratones, se ha descrito que la eliminación de la enzima degradadora de insulina reduce la degradación de péptido beta-amiloide en más del 50%. (10) Por el contrario, la sobreexpresión de neprilisina o de la enzima degradadora de la insulina evita la formación de la placa. (11)

El hecho de por qué el depósito del péptido beta-amiloide está débilmente relacionado con el grado de demencia en la enfermedad de Alzheimer ha sido un enigma que sigue sin resolverse. Existe la posibilidad de que el péptido beta-amiloide ejerza sus principales efectos de manera inicial desencadenando una cascada de procesos que, una vez iniciados, ocurran independientemente del mayor o menor depósito de péptido beta-amiloide. (5) Esta teoría se basa en un ensayo de inmunización que se hizo con péptido beta-amiloide humano. Así, el depósito de péptido beta-amiloide cerebral en estos casos fue mucho menor de lo que podría esperarse en relación con el estadio clínico determinado. A pesar de la cantidad notablemente menor de péptido beta-amiloide cerebral, presumiblemente causada por la inmunoterapia, los sujetos continuaron con un descenso de sus capacidades cognitivas hacia una demencia que en su etapa terminal era clínicamente indistinguible de una enfermedad de Alzheimer no tratada. (12) Sin embargo, debemos decir que el estudio se realizó con un número reducido de pacientes, por lo que sus resultados no son totalmente concluyentes. Pese a esto, podemos especular con dichos resultados que el péptido beta-amiloide actúa como desencadenante de un proceso degenerativo que continúa incluso si se elimina. (13) No está claro cuál podría ser el mecanismo para esta

degeneración continua e independiente de péptido beta-amiloide, aunque una acumulación continua de proteína Tau hiperfosforilada y plegada incorrectamente, que conduzca directamente a una mayor pérdida de neuronas, es quizás la teoría más probable. Sin embargo, esta es una hipótesis difícil de probar porque requiere la identificación de sujetos con enfermedad de Alzheimer en una etapa preclínica inicial, algo que actualmente no es posible incluso con los medios más sensibles para diagnosticar la enfermedad.



**Figura 3:** Representación de la creación del péptido beta-amiloide. Debido a la acción de las enzimas BACE-1 primero y gamma-secretasa después, se pasa de la proteína precursora de amiloide al péptido beta-amiloide, el cual se agregará entre sí formando placas. (14)

Otra posible explicación es que una forma específica de péptido beta-amiloide sea la responsable de la muerte neuronal masiva que caracteriza a la enfermedad. Las herramientas utilizadas para cuantificar péptido beta-amiloide no pueden distinguir el péptido beta-amiloide causante de Alzheimer de formas menos relevantes, lo que debilita la correlación entre la cantidad de péptido beta-amiloide con el estadio clínico. Una analogía de esta situación se encuentra en las enfermedades priónicas en las que la misma proteína puede asumir múltiples conformaciones, cada una de las cuales causa neurodegeneración en distintas regiones cerebrales lo que da lugar a diferentes presentaciones clínicas. (15)

La otra causa principal que se asocia al desarrollo de la patología de la enfermedad de Alzheimer es la proteína Tau (figura 4). Los ovillos neurofibrilares, que son inclusiones filamentosas en las neuronas piramidales, aparecen en la enfermedad de Alzheimer y en otros trastornos neurodegenerativos denominados taupatías. La cantidad de ovillos neurofibrilares es un marcador patológico de la gravedad de la enfermedad de Alzheimer. El componente principal de los ovillos es una forma anormalmente hiperfosforilada y agregada de la proteína Tau. Normalmente, se trata de una proteína soluble que abunda en los axones y que promueve el ensamblaje y la estabilidad de los microtúbulos y el transporte de vesículas. (16) La Tau hiperfosforilada es insoluble, carece de afinidad por los microtúbulos y se autoagrega en filamentos helicoidales. Al igual que los oligómeros de péptido beta-amiloide, los agregados anormales de la proteína Tau son citotóxicos y alteran la cognición. (17,18)

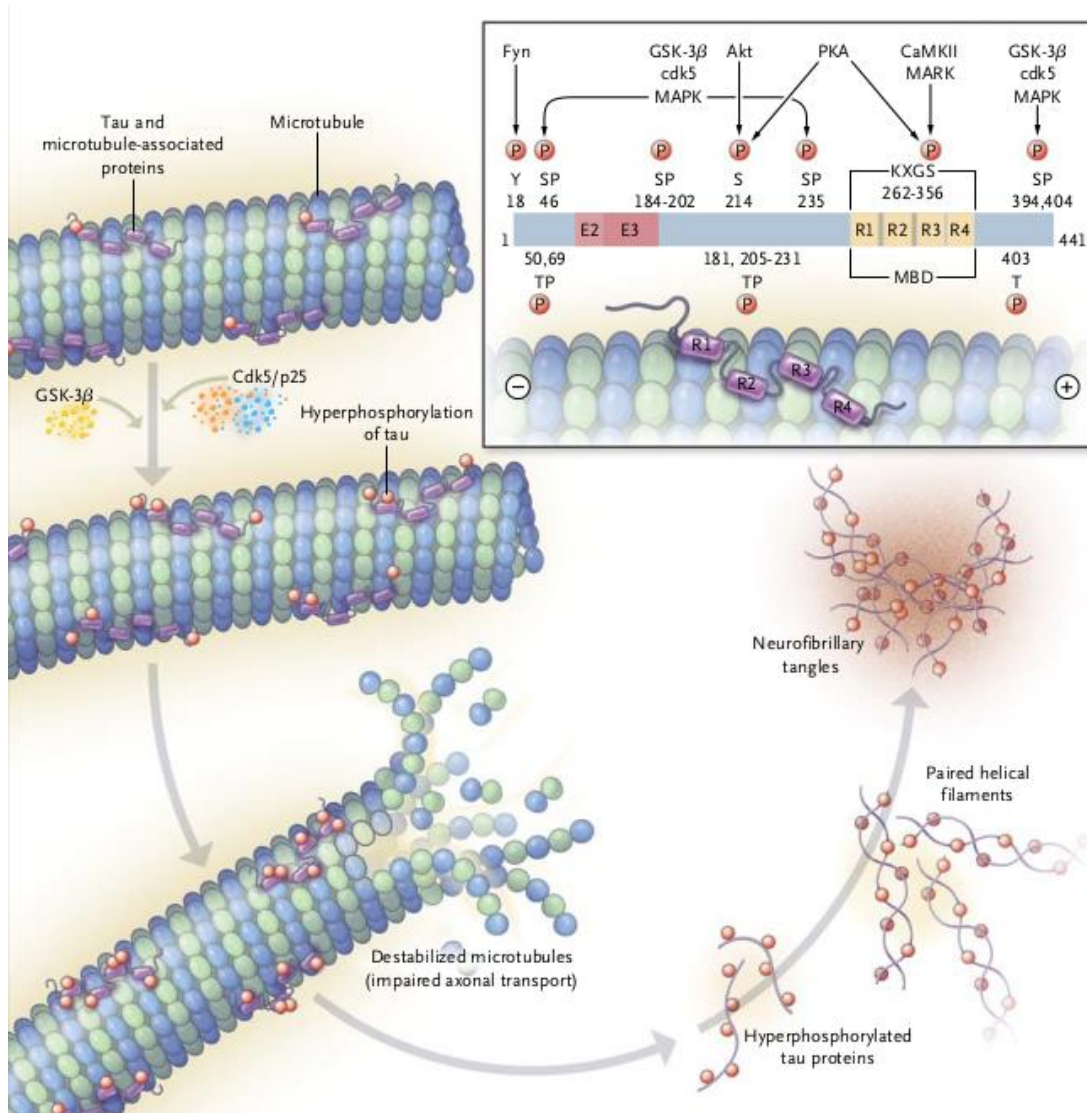


Se han detectado más de 30 mutaciones de la proteína Tau en el cromosoma 17 en la demencia frontotemporal con parkinsonismo. Por el contrario, las mutaciones de Tau no aparecen en la enfermedad de Alzheimer, y el grado de pérdida de neuronas no está relacionado con el número de ovillos neurofibrilares. Sin embargo, el aumento de los niveles de Tau hiperfosforilada y Tau total en el líquido cefalorraquídeo se correlaciona con reducciones en las puntuaciones en los exámenes cognitivos. Diferentes estudios indican que la acumulación de péptido beta-amiloide precede y conduce a la agregación de Tau. (19–21)

El aumento del estrés oxidativo, la alteración de la función de plegamiento de la proteína del retículo endoplásmico y la deficiente eliminación de las proteínas dañadas, mediada por proteasomas y por autofagia, todas ellas asociadas al envejecimiento, aceleran la acumulación de proteínas amiloides y Tau en la enfermedad de Alzheimer.

Para ilustrar como se produce la hiperfosforilación de la proteína Tau y su agregación en ovillos neurofibrilares tenemos la figura 4. En ella en la parte superior, vemos como cuatro secuencias repetidas (R1-R4) conforman el dominio de unión a microtúbulos de Tau. La fosforilación normal de Tau se produce en los residuos de serina (S) y treonina (T), numerados según su posición en la secuencia completa de la proteína Tau. Cuando son seguidos por la prolina (P), estos aminoácidos son fosforilados por la glucógeno sintetasa quinasa 3 (GSK-3 $\beta$ ), la quinasa dependiente de ciclina (cdk5) y su subunidad activadora p25, o la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK). La unión de Tau al microtúbulo en condiciones normales promueve el ensamblaje y la estabilidad de los microtúbulos. Sin embargo, cuando la quinasa está excesivamente activada, la proteína Tau se hiperfosforila desestabilizando los microtúbulos. Posteriormente, si continua la hiperfosforilación de Tau, esta se desprende y se autoagrega formando primero los filamentos helicoidales y posteriormente los ovillos neurofibrilares.





**Figura 4:** Representación de la hiperfosforilación de la proteína Tau, desestabilización de los microtúbulos, formación de filamentos helicoidales y agregación final en ovillos neurofibrilares. (14)

Además del depósito de placas extracelulares de péptido beta-amiloide y de los ovillos neurofibrilares de la proteína Tau, que son los principales hallazgos patológicos que encontramos en la enfermedad de Alzheimer, hay otras patologías que provocan el desarrollo del Alzheimer.

En este apartado de neurobiología merece la pena citar una de las principales hipótesis por las que se ha intentado explicar la neuropatología de la enfermedad de Alzheimer y por la que se ha basado el tratamiento de la enfermedad. Esta hipótesis se basa en un descenso en la liberación de acetilcolina y por ello se trata a los pacientes con inhibidores de la acetilcolinesterasa, la enzima responsable de degradar y retirar la acetilcolina de la sinapsis neuronal, para así aumentar los niveles de acetilcolina en la sinapsis neuronal y mejorar la clínica. Sin embargo, estos fármacos no han resultado ser muy efectivos ya sea a la hora de prevenir o de tratar la enfermedad. (22)

Una de las relaciones más descritas es la que existe entre los estrógenos y la enfermedad de Alzheimer. Así, los estudios muestran que hay muchas más mujeres que hombres con enfermedad de Alzheimer. (4) Esto se debe a la disminución de los niveles de estrógenos en mujeres postmenopáusicas. Por eso, las mujeres que se someten a un tratamiento sustitutivo con estrógenos tienen una disminución en el riesgo de sufrir Alzheimer. El hecho de que una menor concentración de los niveles de estrógenos esté en relación con un riesgo mayor de padecer Alzheimer se debe a que el 17beta-estradiol tiene un efecto antioxidante, protegiendo de la peroxidación que causa el péptido beta-amiloide, por lo que tendría un efecto neuroprotector que desaparecería tras la menopausia. (23)

Otra patología asociada con el péptido beta-amiloide es que es muy tóxico para las mitocondrias. En la enfermedad de Alzheimer, la exposición al péptido beta-amiloide inhibe enzimas mitocondriales clave, (24,25) como la citocromo c oxidasa la cual es atacada específicamente. Como consecuencia, el transporte de electrones, la producción de ATP, el consumo de oxígeno y el potencial de membrana se ven alterados. En base a ello, el incremento en la formación del radical superóxido mitocondrial y su conversión en peróxido de hidrógeno causa estrés oxidativo, liberación del citocromo c y finalmente muerte celular por apoptosis. (26)

En la enfermedad de Alzheimer, el daño vascular y la inflamación parenquimatosa perpetúan el ciclo de agregación de proteínas y daño oxidativo en el cerebro. Las lesiones isquémicas afectan del 60% al 90% de los pacientes con Alzheimer, encontrándose un ictus mayor hasta en un tercio de las autopsias de pacientes con Alzheimer. Esto se debe a que la mayoría de los casos de demencia presentan causas mixtas, no teniendo una etiología única. Además, en el 90% de los pacientes con Alzheimer hay cambios patológicos generalizados tales como anomalías capilares, disrupción de la barrera hematoencefálica y placas ateromatosas en los grandes vasos. (27)

En cuanto a la inflamación en la enfermedad de Alzheimer, la microglía activada y los astrocitos localizados en las placas fibrilares con sus marcadores bioquímicos están aumentados. Inicialmente, la microglía fagocita y degrada el péptido beta-amiloide. (28) Sin embargo, la activación crónica de la microglía hace que esta libere quimoquinas y una cascada de citoquinas proinflamatorias tales como interleucina-1, interleucina-6 y el factor de necrosis tumoral alfa. También se ha demostrado que aumenta la activación de la vía clásica del complemento y los reactantes de fase aguda. Todo esto colabora con la disrupción de la barrera hematoencefálica por lo que hace empeorar la enfermedad. (29)

La pérdida de la regulación del calcio es un hallazgo común en varios trastornos neurodegenerativos. (30,31) Las presenilinas, una familia de proteínas transmembrana, modulan el balance de calcio. Las mutaciones de presenilina causan aproximadamente la mitad de los pocos casos de enfermedad de Alzheimer (<1%) que son de tipo familiar de inicio temprano. Estas mutaciones podrían alterar la homeóstasis del calcio en el retículo endoplásmico. En la enfermedad de Alzheimer, las concentraciones elevadas de

calcio en el citosol debido posiblemente a la disfunción de las presenilinas, estimulan la agregación del péptido beta-amiloide y la amiloidogénesis.(32)

Otra de las desregulaciones que se ha planteado es la de un fallo en la supresión normal del ciclo celular en la enfermedad de Alzheimer. Los marcadores de reentrada aberrante en el ciclo celular se detectan en todas las etapas de la enfermedad de Alzheimer y en el deterioro cognitivo leve, pero son más prominentes en el inicio de la fase G1-S. (33) Este defecto de reentrada puede progresar hasta completar la replicación del ácido desoxirribonucleico (ADN), dando como resultado neuronas tetraploides y activación de las ciclinas mitóticas, pero sin mitosis final. Estas neuronas tetraploides no son viables y acaban por morir. (34)

Un defecto en el metabolismo del colesterol es una hipótesis interesante en la enfermedad de Alzheimer porque vincula un defecto genético en la apolipoproteína E (APOE), principal componente molecular de las apoproteínas en los quilomicrones que tiene un papel importante en el metabolismo de las lipoproteínas. Este defecto genético desencadenaría la producción y agregación de amiloide y la vasculopatía de la enfermedad de Alzheimer (explicada anteriormente). El colesterol es un componente esencial de las membranas neuronales y se concentra en las islas esfingolípidas denominadas balsas lipídicas. Las balsas lipídicas son plataformas ordenadas cuya función es el ensamblaje de beta-secretasas, gamma-secretasas y el procesamiento de la proteína precursora de amiloide en el péptido beta-amiloide. La generación y la agregación del péptido beta-amiloide se incrementa y el aclaramiento del péptido del cerebro se reduce cuando un exceso de colesterol esterificado disminuye el recambio de lípidos de la membrana. La APOE es el principal transportador de colesterol en el cerebro. Un determinante importante del riesgo de enfermedad de Alzheimer de inicio tardío es el patrón de herencia de isoformas APOE (APOE2, APOE3 o APOE4): un solo alelo E4 aumenta el riesgo de padecer Alzheimer multiplicándolo por 4, y dos alelos E4 aumentan el riesgo multiplicándolo por 19. APOE4 no solo es una proteína chaperona patológica que promueve el depósito de péptido beta-amiloide y la fosforilación de Tau, sino que también es el menos efectivo de las tres isoformas de APOE en la promoción de la renovación de la membrana lipídica y la captación de partículas de lipoproteínas. Los niveles elevados de colesterol sérico en edades medias de la vida aumentan el riesgo de enfermedad de Alzheimer en el futuro. (35) En estudios observacionales, se demostró que el uso de estatinas estaba asociado con un riesgo reducido, ya que estas disminuyen la cantidad de colesterol libre circulante previniendo que un exceso de colesterol disminuya el recambio de lípidos de la membrana celular. (36)

### 1.3 LIMITACIONES DE LA TERAPÉUTICA ACTUAL

Durante los últimos años, uno de los objetivos principales de la investigación médica fue comprender mejor los mecanismos moleculares involucrados en el inicio de la enfermedad de Alzheimer para el desarrollo de tratamientos farmacológicos seguros y efectivos. Sin embargo, las estrategias de tratamiento que han resultado ser exitosas para la enfermedad de Alzheimer han sido hasta

ahora limitadas. Los tratamientos actuales disponibles para la enfermedad de Alzheimer son solo sintomáticos, principalmente para tratar de contrarrestar el defecto en el neurotransmisor que está disminuido, la acetilcolina, con inhibidores de la acetilcolinesterasa. (37) Los inhibidores de la acetilcolinesterasa, como neostigmina, rivastigmina, galantamina, donepezil o tacrina entre otros, se asocian con efectos adversos gastrointestinales, como náuseas y vómitos, que generalmente conducen a la interrupción del tratamiento. (38,39) La tacrina tiene una vida media corta y el paciente necesita hasta cuatro administraciones por día. (40) Además, los pacientes que usan el medicamento tienen que realizar un análisis periódico de sangre para comprobar los niveles de enzimas hepáticas debido a su hepatotoxicidad. (41) Además, la galantamina y la rivastigmina exhiben una vida media de 7 y 2 horas, respectivamente. El uso de memantina (antagonista del receptor N-metil-D-aspartico (NMDA) puede causar efectos como mareos, confusión, estreñimiento y vómitos. (42) Por otro lado, estos tratamientos establecidos solo proporcionan alivio sintomático transitorio, mejorando temporalmente la función cognitiva, pero no retrasan la progresión a largo plazo del deterioro.

El tratamiento de enfermedad de Alzheimer también está complicado por la presencia de la barrera hematoencefálica, una barrera física y bioquímica que protege al cerebro de posibles sustancias peligrosas en el flujo sanguíneo y que impide el paso y, por lo tanto, la actividad del 98% de los potenciales neurofármacos. (43)

En resumen, el fracaso de la terapia ocurre debido a una farmacocinética y farmacodinámica desfavorable de los fármacos. El fracaso de la farmacoterapia es el resultado de una química y una física inadecuada de los fármacos (como la hidrofobicidad), la absorción desfavorable por parte de las membranas biológicas (debido a la barrera hematoencefálica), los parámetros farmacocinéticos desfavorables (como su corta vida media) y la toxicidad para los tejidos (hepatotoxicidad, neurotoxicidad o toxicidad renal). Por lo tanto, existe una necesidad urgente de desarrollar estrategias para mejorar la eficacia, el transporte a través de la barrera hematoencefálica, la biodisponibilidad y simultáneamente limitar los efectos adversos de los compuestos farmacéuticos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

Una solución a este problema sería el uso de la nanomedicina mediante el diseño de fármacos conjugados con nanopartículas, ya que podrían mejorar la farmacocinética y farmacodinámica de los mismos y a la vez podrían exhibir una toxicidad mínima. (44,45) Además, la efectividad de un tratamiento podría aumentarse incorporando sistemas de administración de fármacos en nanopartículas ya que aumentaría su selectividad, llegando exclusivamente donde se encuentran la patología causante de la enfermedad. (46) Más adelante profundizaremos en los potenciales usos de la nanomedicina en el campo del diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

## 1.4 LIMITACIONES EN EL DIAGNÓSTICO ACTUAL

En el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer, la imagen ha pasado de un papel menor a una posición central. Las imágenes proporcionan información sobre los efectos de la enfermedad de Alzheimer y su evolución temporal y espacial. (47) La tomografía computarizada (TC), la resonancia magnética (RM) y la tomografía por emisión de positrones (PET), son los distintos tipos de técnicas de imagen que se pueden usar en la diagnosis de la enfermedad de Alzheimer.(48)

La RM cerebral o la TC están indicadas para detectar lesiones que pueden causar deterioro cognitivo. En los pacientes con enfermedad de Alzheimer, las RM cerebrales o las TC pueden mostrar atrofia cortical y cerebral difusa, pero estos hallazgos no son diagnósticos de enfermedad de Alzheimer.

Las imágenes obtenidas mediante tomografías computarizadas pueden mostrar atrofia cerebral, cambios longitudinales en el tamaño del cerebro, y agrandamiento de los ventrículos laterales y tercer ventrículo. Este enfoque puede ser útil para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer.

Por otro lado, las mediciones mediante RM de las estructuras cerebrales del hipocampo, amígdala, ventrículos laterales, tercer ventrículo y región anterior basal del parénquima cerebral, tienen una sensibilidad del 77% en la confirmación del diagnóstico ante una sospecha de la enfermedad de Alzheimer. (49)

Sin embargo, la RM carece de especificidad molecular. No puede detectar directamente las características histopatológicas de la enfermedad de Alzheimer (placas de péptido beta-amiloide u ovillos neurofibrilares). Adicionalmente, la atrofia cerebral es un hallazgo inespecífico de daño neuronal y, si bien ciertos patrones de pérdida de parénquima cerebral son característicos de algunas enfermedades, estos no son totalmente específicos. Los patrones de atrofia de ciertas enfermedades se superponen con los patrones de otras enfermedades. Además, las formas inusuales de enfermedad de Alzheimer presentan patrones atípicos de atrofia. (50)

Por último, el PET es útil para comprender la patogenia de la enfermedad de Alzheimer, realizar el diagnóstico definitivo de la enfermedad de Alzheimer y monitorizar la progresión de la enfermedad y la respuesta al tratamiento. El PET implica la introducción de un marcador radioactivo en el cuerpo humano, generalmente a través de una inyección intravenosa. El PET mide el metabolismo de la glucosa en el cerebro mediante el uso de 2-[18F]fluoro-2-desoxi-d-glucosa. Los pacientes con enfermedad de Alzheimer tienen un hipometabolismo de glucosa en los lóbulos temporoparietales, que se correlaciona con la gravedad de la demencia y puede ser evaluado utilizando PET con fluorodesoxiglucosa. (51,52)

Sin embargo, el uso del PET tiene diversas limitaciones. La retención de fluorodesoxiglucosa en el cerebro es un indicador inespecífico del metabolismo cerebral que puede alterarse por distintos motivos, como pueda ser la isquemia

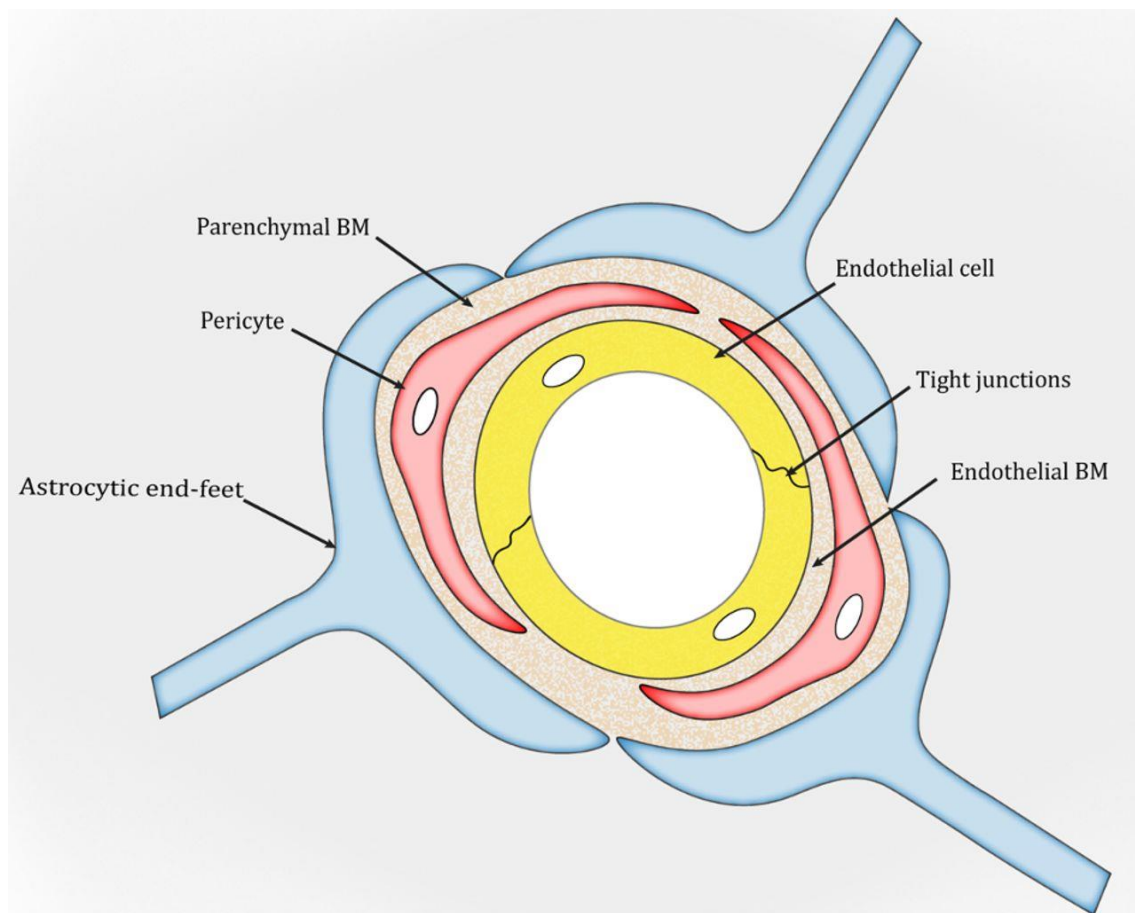


o la inflamación. Además, es una técnica muy costosa y que requiere exposición a radioactividad (aunque sea a muy bajas dosis). (50)

Es por eso, que están en desarrollo nanopartículas para lograr la detección de las placas de péptido beta amiloide y los ovillos neurofibrilares de proteínas Tau o como agentes de imagen para PET.

## 1.5 LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA

La barrera hematoencefálica actúa como una barrera física que regula el paso de moléculas desde el torrente sanguíneo al cerebro. (53) Los vasos sanguíneos de la barrera hematoencefálica se componen de dos tipos de células principales: las células endoteliales que forman las paredes de los vasos sanguíneos y los pericitos que se asientan en la superficie abluminal (superficie externa del vaso) de las células endoteliales. Las propiedades de la barrera hematoencefálica se manifiestan en gran medida por las características de las células endoteliales, pero estas propiedades son inducidas y mantenidas por interacciones entre pericitos, células inmunes, astrocitos y membrana basal (figura 5). A continuación, pasamos a explicar las características y las funciones de las mismas.



**Figura 5:** Representación de las células que componen la barrera hematoencefálica. En la imagen vemos la célula endotelial, el pericito, el astrocito, la unión estrecha y las dos clases de membrana basal. (54)

## CÉLULAS ENDOTELIALES

Las células endoteliales son células epiteliales escamosas simples modificadas derivadas del epitelio mesodérmico que forman las paredes de los vasos sanguíneos. La superficie de las arterias y las grandes venas puede estar formada por docenas de células endoteliales, mientras que el capilar más pequeño está formado por solo una célula endotelial que se pliega sobre sí misma para formar la luz del vaso. Estas células endoteliales microvasculares del sistema nervioso central son células extremadamente finas, siendo un 39% menos gruesas que las células endoteliales del tejido muscular.

Las células endoteliales del sistema nervioso central tienen propiedades únicas en comparación con las células endoteliales de otros tejidos, que les permiten regular eficazmente el movimiento de iones, moléculas y células entre la sangre y el cerebro. Las células endoteliales del sistema nervioso central se mantienen unidas por uniones estrechas o *tight junctions*, que limitan en gran medida el flujo paracelular de los solutos. Las células endoteliales del sistema nervioso central tienen tasas extremadamente bajas de transcitosis en comparación con las células endoteliales periféricas, lo que restringe en gran medida el movimiento transcelular de solutos mediado por vesículas. (55,56)

## PERICITOS

Dentro de los pericitos se incluyen las células vasculares de músculo liso que rodean los grandes vasos y los pericitos, que recubren de forma incompleta las paredes endoteliales de la microvasculatura. Los pericitos son células que se asientan sobre la superficie abluminal del tubo endotelial microvascular y están incrustadas en la membrana basal vascular. Los pericitos extienden largas prolongaciones celulares a lo largo de la superficie abluminal del endotelio abarcando a menudo varias células endoteliales. Estas células contienen proteínas contráctiles y tienen la capacidad de contraerse para controlar el diámetro del capilar. (57,58) Aunque los pericitos alinean el tubo endotelial, la mayoría del cuerpo celular y las prolongaciones no tocan el endotelio, sino que están separadas por la membrana basal en la que están incrustados. Las prolongaciones forman adherencias celulares con el endotelio en puntos concretos, descritos como uniones de clavija y zócalo, y están mediados por la molécula de adhesión N-cadherina. (59) Además, se han identificado otras adherencias celulares pericito-endoteliales que incluyen *zonulas adherens*, uniones gap y uniones estrechas. (60)

Se ha demostrado que los pericitos del sistema nervioso central tienen propiedades únicas en comparación con los pericitos de otros tejidos. Los pericitos del sistema nervioso central proceden de la cresta neural, en contraste con los pericitos de tejidos periféricos, que derivan del mesodermo. (61) Además, la microvasculatura del sistema nervioso central tiene la mayor cobertura de pericitos, con una relación célula endotelial-pericito estimada entre 1:1 y 3:1, mientras que el músculo tiene una proporción de 100:1. Los pericitos desempeñan funciones importantes en la regulación de la angiogénesis, el depósito de la matriz extracelular, la cicatrización de heridas, la regulación de la infiltración de células inmunitarias y la regulación del flujo sanguíneo en respuesta a la actividad neuronal, y algunos estudios sugieren que también



pueden ser células madre multipotentes del sistema nervioso central. (62) Además, se ha demostrado que estas células son importantes para regular la formación de la barrera hematoencefálica durante el desarrollo, así como para mantener su función en la edad adulta y el envejecimiento. (63,64)

## MEMBRANA BASAL

El vaso sanguíneo cerebral está rodeado por dos membranas basales, la membrana basal vascular interna y la membrana basal parenquimatosa externa, también llamada glía vascular *limitans perivascularis*. (65,66) La membrana basal vascular está compuesta por una matriz extracelular secretada por las células endoteliales y los pericitos, mientras que la membrana basal parenquimatosa se secreta principalmente por prolongaciones de los astrocitos que se extienden hacia la vasculatura. Estas membranas basales están compuestas por diferentes moléculas entre las que se incluyen colágeno tipo IV, laminina, nidógeno, proteoglicanos de sulfato de heparina y otras glicoproteínas. Las membranas basales vasculares y parenquimatosas tienen una composición diferente, por ejemplo, la primera está formada por lamininas alfa4 y alfa5, mientras que la segunda contiene lamininas alfa1 y alfa2. (66,67) Estas membranas basales proporcionan un anclaje para muchas moléculas de señalización en el tejido vascular, pero también proporcionan una barrera adicional a cruzar para las moléculas y las células antes de acceder al tejido neural. La interrupción de estas membranas basales por metaloproteinasas es una causa importante de disfunción de la barrera hematoencefálica y la infiltración de leucocitos que se observa en diferentes trastornos neurológicos.

## ASTROCITOS

Los astrocitos son una clase importante de células gliales, que extienden prolongaciones celulares que cubren las células neuronales o los vasos sanguíneos en el sistema nervioso central. (68) El extremo de la prolongación cubre casi completamente el tubo vascular y contienen una serie de proteínas entre las que se incluyen distroglicano, distrofina y acuaporina 4. El complejo de distroglicano-distrofina es importante para unir el citoesqueleto del extremo de las prolongaciones con la membrana basal mediante la unión al proteoglicano agrina. (69,70) Este enlace coordina la acuaporina 4 en matrices octogonales de partículas, lo cual es crítico para regular la homeostasis del agua en el sistema nervioso central. Los astrocitos proporcionan un enlace celular entre las células neuronales y los vasos sanguíneos. Este acoplamiento neurovascular permite a los astrocitos transmitir señales que regulan el flujo sanguíneo en respuesta a la actividad neuronal. (71,72) Esto incluye la regulación de la contracción y la dilatación de las células del músculo liso vascular que rodean a las arteriolas, así como los pericitos que rodean los capilares. Los astrocitos se han identificado como importantes mediadores de la formación y función de la barrera hematoencefálica debido a la capacidad de los astrocitos de inducir propiedades de barrera en vasos sanguíneos que no son del sistema nervioso central en estudios de trasplante, así como para inducir propiedades de barrera en células endoteliales cultivadas *in vitro*. (68)

## CÉLULAS INMUNES

Los vasos sanguíneos del sistema nervioso central interactúan con diferentes poblaciones de células inmunes tanto en la sangre como en el sistema nervioso central. Las dos principales poblaciones de células inmunes dentro del sistema nervioso central son macrófagos perivasculares y células microgliales. Los macrófagos perivasculares son células del linaje de los monocitos que se encuentran en el lado abluminal del tubo vascular que se localiza comúnmente en el espacio de Virchow-Robin, un pequeño canal lleno de líquido que recubre la superficie abluminal de las venas y arterias que entran y salen del sistema nervioso central. (73) Estas células proporcionan una primera línea de inmunidad innata al fagocitar los desechos celulares. Las células microgliales son células inmunes parenquimatosas del sistema nervioso central derivadas de los progenitores en el saco vitelino y que entran en el cerebro durante el desarrollo embrionario. (74) Estas células participan en la regulación del desarrollo neuronal, la respuesta inmune innata y la curación de heridas, y pueden actuar como células presentadoras de antígenos en la inmunidad adaptativa. (75,76) Además, las diferentes poblaciones de células inmunitarias transmitidas por la sangre, incluidos los neutrófilos, los linfocitos T y los macrófagos, pueden interactuar con los vasos del sistema nervioso central cuando se activan y se piensa que regulan las propiedades de la barrera hematoencefálica en respuesta a infecciones, las lesiones y las enfermedades al liberar especies reactivas de oxígeno que pueden aumentar la permeabilidad vascular. (77,78)

## TRANSPORTE A TRAVÉS DE LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA

Como ya hemos explicado, la barrera hematoencefálica regula el paso de moléculas hacia el cerebro y, por tanto, también limita los fármacos que pueden llegar al cerebro tras su administración por vía sistémica. Por ello, más del 98% de las nuevas moléculas terapéuticas potenciales son incapaces de cruzar la barrera hematoencefálica. (53) Si no existiera la barrera hematoencefálica, la microvasculatura cerebral proporcionaría una vía extraordinaria de acceso al cerebro ya que dicha microvasculatura tiene una superficie total de 20 metros cuadrados y una longitud total de 640 kilómetros. Esta gran vascularización hace que las moléculas pequeñas, por difusión simple, penetren en el cerebro en solo medio segundo. (79) En este punto ya hemos comentado que el transporte se ve limitado por las células endoteliales, por las membranas basales y por los astrocitos, sin embargo, existen métodos que permiten transportar moléculas a través de la barrera hematoencefálica.

El transporte de moléculas de soluto a través de la membrana de la barrera hematoencefálica se realiza mediante cinco mecanismos diferentes: (80)

- **Difusión paracelular:** este es un proceso insaturable y no competitivo que ocurre entre las células. La presencia de uniones estrechas en las células endoteliales del cerebro limita enormemente la difusión paracelular. Sólo las moléculas pequeñas solubles pueden difundirse a través de la barrera hematoencefálica al pasar a través de las uniones estrechas.

- **Difusión transcelular:** esto tiene lugar a través de las células, y es igualmente insaturable y no competitivo. Las propiedades de las sustancias requeridas para el transporte transcelular son: alta lipofilidad y bajo peso molecular. Una alta lipofilidad y un peso molecular menor a 450 Daltons facilita el transporte de la molécula al cerebro.
- **Transporte mediado por transportadores:** el intercambio de sustancias entre la sangre circulante y el cerebro, incluidos los nutrientes, se produce de forma activa, mediante sistemas de transporte selectivo unidos a la membrana. El proceso de transporte mediado por el transportador conlleva el desarrollo de poros estrechos transitorios, inducidos por la unión del sustrato particular al transportador, que a su vez permite solo el paso de moléculas de sustrato específicas. En este punto se han descrito varios sistemas de transportadores en los capilares cerebrales: transportadores específicos, con actividades reguladas por las necesidades metabólicas del cerebro y por la concentración de diversos sustratos en el plasma, facilitan la transferencia de distintos nutrientes, como la glucosa, galactosa, aminoácidos, nucleósidos, lactatos y piruvatos, adenina y guanina, colina y vitaminas y hormonas. (81) Como la glucosa es la principal fuente de energía para el cerebro, los transportadores de glucosa, como GLUT1 y GLUT3, son de gran importancia. Igualmente, importante es el sistema transportador de monocarboxilato. (82) Además, existen portadores especializados para aminoácidos esenciales y vitaminas. (83)
- **Endocitosis mediada por receptores:** algunas proteínas y hormonas endógenas grandes son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica por endocitosis mediada por ciertos receptores presentes en el lado luminal de la barrera. Se han identificado receptores específicos para la insulina, factores de crecimiento similares a la insulina, angiotensina II, folatos y transferrina. (84) Los lípidos también pueden internalizarse en el cerebro en forma de lipoproteínas de baja densidad (LDL), que son reconocidas y endocitadas por las células endoteliales, gracias a la expresión de varias apolipoproteínas (especialmente ApoE) en la superficie de la LDL. (85) Las proteínas policationicas, como las albúminas cationizadas o las inmunoglobulinas, se pueden transportar a través de la barrera hematoencefálica mediante transcitosis, sin la participación de receptores específicos de membrana de plasma. En este caso, la endocitosis se inicia por la asociación de sustancias policationicas con las cargas negativas presentes en la membrana plasmática de las células endoteliales. (86)
- **Transcitosis mediada por adsorción:** Muchas estrategias de administración de fármacos cerebrales se han centrado en la transcitosis mediada por adsorción, que se desencadena por la interacción electrostática entre las moléculas catiónicas y los microdominios aniónicos en la membrana del citoplasma de las células endoteliales capilares del cerebro. La administración de fármacos basada en transcitosis mediada por adsorción al cerebro se puede lograr mediante el uso de proteínas catiónicas y oligopéptidos básicos, como los péptidos

que penetran en las células. Las moléculas terapéuticas de gran tamaño, como los neuropéptidos y las proteínas, o incluso los vectores encapsulados con medicamentos, como los liposomas y las nanopartículas poliméricas, pueden tener acceso al parénquima cerebral a través de la transcitosis mediada por adsorción cuando se conjugan con estas moléculas catiónicas. (87)

Desde el punto de vista de la administración de fármacos, estos distintos métodos de transporte a través de la barrera hematoencefálica pueden ayudar a la administración de fármacos al cerebro, ya que los fármacos o profármacos pueden ingresar al cerebro a través alguno de estos mecanismos de transporte en concentraciones terapéuticas, imitando nutrientes o compuestos endógenos.

Además, en el lado luminal de las células endoteliales está presente el sistema de la glicoproteína P. Esta es una proteína de transporte de fármacos dependiente de ATP. Se ha demostrado, tanto *in vitro* como *in vivo*, que la glicoproteína P puede dificultar la acumulación de muchas moléculas en el cerebro, expulsándolas de las células. La inhibición de la glicoproteína P se ha propuesto como una posible estrategia para mejorar la entrada de los fármacos en el cerebro. (88,89)

La combinación de estos mecanismos físicos y metabólicos hace que sea extremadamente difícil transmitir moléculas específicas al cerebro. Ahora se conoce que, para que una molécula de un fármaco cruce la barrera hematoencefálica, entre otros requisitos, debe tener una alta solubilidad en los lípidos, una masa molecular que sea <450 Daltons, y no ser un sustrato para los transportadores de flujo de salida activos. (90)

## 1.6 NANOMEDICINA

La nanomedicina se basa en el uso de los nanomateriales (no solo nanopartículas) para la prevención, diagnóstico y tratamiento de distintas patologías. (91)

Actualmente la mayoría de las investigaciones en la nanomedicina están enfocadas al tratamiento del cáncer, en concreto a la liberación controlada y dirigida de fármacos. También se están haciendo esfuerzos en el desarrollo de sistemas para la regeneración de tejidos musculares, cartilagosos y óseos. (92)

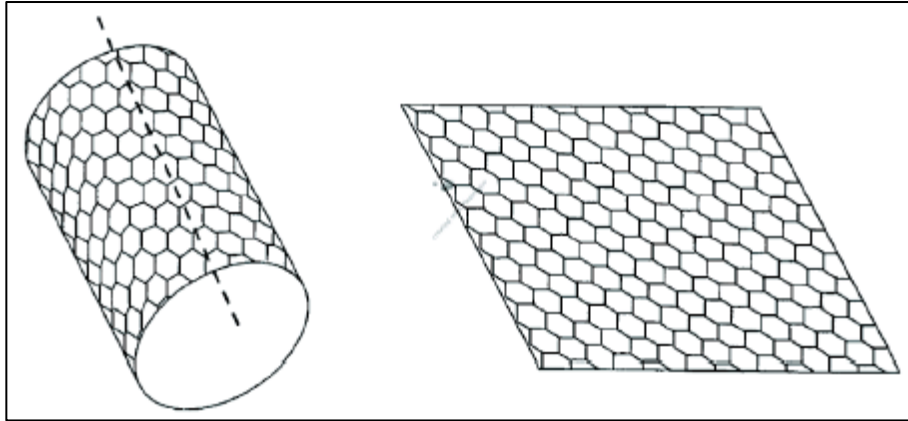
Como acabamos de comentar el foco de las investigaciones en nanomedicina está en la creación de nanofármacos que sean capaces de llegar de forma específica al órgano diana atravesando las distintas barreras del organismo y actuando en el lugar deseado sin producir efectos adversos no deseados en el resto del organismo. Estas son las razones por las que el desarrollo está tan centrado en nanofármacos antineoplásicos, ya que la terapia clásica contra el cáncer no actúa de manera dirigida y produce unos efectos secundarios bastante desagradables. (92)

Para que los fármacos actúen solo a nivel local tenemos dos estrategias de biodistribución, pasiva o activa. En la biodistribución pasiva los nanofármacos emplean la separación que existe entre las células endoteliales para atravesar dichos espacios intercelulares y llegar al intersticio afectado. Por otro lado, en la biodistribución activa el objetivo es que el fármaco se acumule de forma específica en el tejido diana. Esta biodistribución activa se basa en utilizar nanosistemas para la vehiculización de fármacos, los cuales serían dirigidos de manera selectiva al tejido objetivo siendo los fármacos liberados solo al alcanzar el lugar deseado. Con esto lograríamos uno de los objetivos citados anteriormente, actuar localmente sin producir efectos indeseados a otros niveles. (93)

Gracias al tamaño de estas estructuras (del orden del tamaño de una nanopartícula) logran atravesar distintas barreras biológicas que no consiguen hacer de manera eficaz los fármacos tradicionales. La principal sería la barrera hematoencefálica, que ya hemos explicado que constituye una gran dificultad en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer así como en otras patologías que afecten al sistema nervioso central como el Parkinson o una neoplasia cerebral. Además de la barrera hematoencefálica, presentar los fármacos asociados a nanosistemas también permitiría atravesar mejor endotelios inflamados, microcapilares o llegar a tejidos tumorales. (94)

Para poder llevar a cabo la idea de liberar de forma controlada el fármaco en un tejido deseado, lo primero es unir el medicamento al nanosistema. Se puede realizar encapsulando el fármaco en el interior del nanosistema o incorporándolo a la superficie exterior del nanoelemento mediante un enlace covalente o no covalente. Lo segundo sería una funcionalización de los nanosistemas para que los fármacos actúen en sus dianas moleculares. (94)

Un ejemplo del uso de la nanomedicina en el tratamiento del cáncer serían los nanotubos de carbono (figura 6). La base de los nanotubos de carbono es grafeno enrollado para formar un tubo. Estos tienen una gran biocompatibilidad y son muy solubles, siendo idóneos para transportar fármacos antineoplásicos, como el cetuximab y el paclitaxel, que si son administrados solos no son muy bien tolerados. Para lograr la especificidad de acción y la liberación localizada y controlada del fármaco, se une a la superficie del nanotubo un anticuerpo. Además, se funcionaliza el nanotubo con polietilenglicol (PEG), con lo que conseguimos evitar la acción del sistema inmune contra el nanotubo, que este cruce la membrana celular y llegue hasta el núcleo, donde finalmente liberará el fármaco. (94)

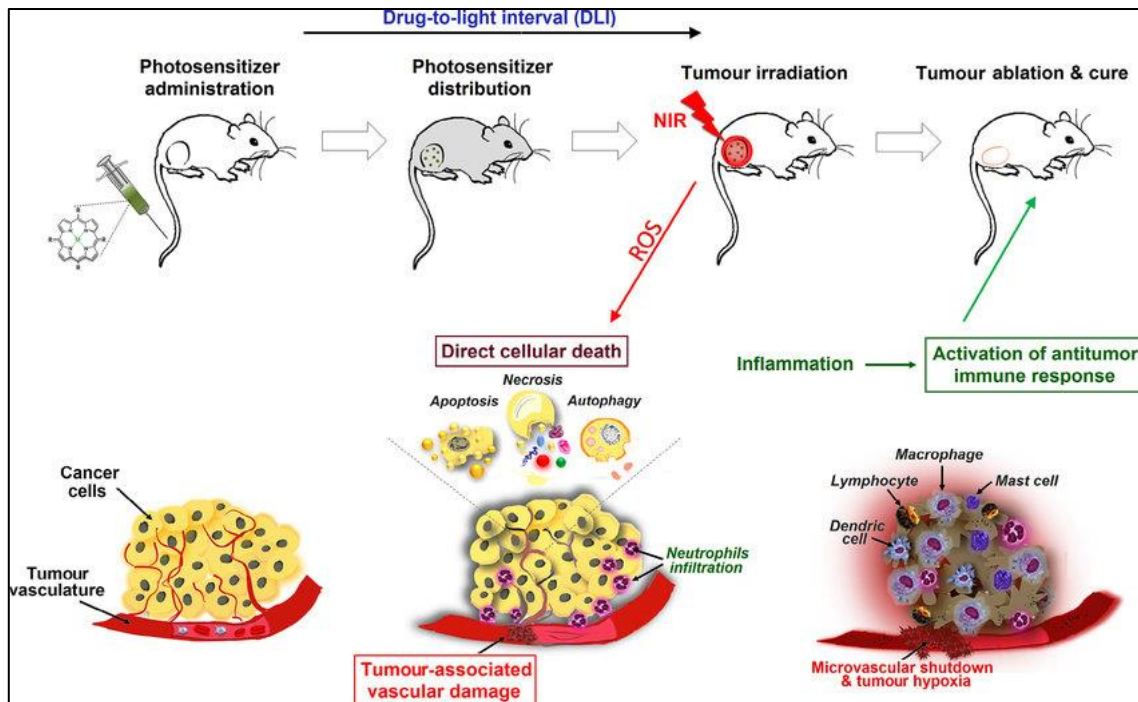


**Figura 6:** Esquema que representa el enrollamiento de una lámina de grafeno para formar un nanotubo de carbono. (95)

Además de su uso en la formación de los nanotubos de carbono, el grafeno puede ser utilizado para transportar fármacos. Sus formas van desde láminas a bastones pasando por esferas. El grafeno para poder ser utilizado para vehiculizar fármacos debe ser modificado a óxido de grafeno pegilado, ya que de esta forma no es detectado como un agente extraño. El óxido de grafeno ha demostrado una gran utilidad para transportar doxorrubicina debido a la gran afinidad de este fármaco por el grafeno. Gracias a esto, se ha conseguido alcanzar grandes dosis de doxorrubicina en el interior de tumores del sistema nervioso como el glioma y el glioblastoma produciendo la muerte de las células tumorales. Además de en tumores del sistema nervioso, el grafeno ha demostrado también un gran papel en tumores ováricos. En los tumores ováricos, un gran problema son las metástasis del mismo, ya que son muy complejas de tratar y el óxido de grafeno ha demostrado tener una gran utilidad en lavados de la cavidad peritoneal. (96)

Otro enfoque para el tratamiento del cáncer mediante nanomedicina sería la Terapia Fotodinámica (o PDT por sus siglas en inglés) (figura 7). La PDT consiste en la administración de un compuesto fotosensible que se concentrará más en el tejido neoplásico debido a la mayor capacidad de las células tumorales de concentrar la sustancia fotosensible. El compuesto fotosensible será un nanosistema. Algunos de los experimentos que se han realizado hasta ahora han sido con nanotubos de carbono, liposomas y grafeno. Posteriormente, a esta sustancia fotosensible se le aplica luz con una longitud de onda concreta produciendo la sustancia fotosensible especies reactivas de oxígeno (para lo cual es necesario presencia de oxígeno en el tejido diana) lo que resulta en la eliminación directa e indirecta de los tumores por apoptosis, necrosis, autofagia, daño vascular y respuesta inflamatoria antitumoral. (97)





**Figura 7:** Representación de los principios de la PDT. Primero se administra un material fotosensible. Tras su distribución por el organismo, se concentrará más en el tejido tumoral. Por último, irradiamos el tumor con luz provocando la creación de especies reactivas de oxígeno, lo que conducirá a la muerte celular por apoptosis, necrosis, autofagia e inflamación. (98)

Actualmente, está aprobado por la Agencia de Administración de Alimentos y Medicamentos Americana el uso de la PDT en lesiones precancerosas en pacientes con esófago de Barrett, en cáncer esofágico y en cánceres de pulmón no microcítico en los que el resto de tratamientos no ha sido efectivo. Pese al enfoque y los resultados prometedores, la PDT presenta diversas limitaciones como que la luz necesaria para activar los compuestos fotosensibles no es capaz de atravesar más de 1 centímetro de espesor. Por esta razón, la PDT es usada para tratar pacientes sobre o justo debajo de la piel o en la envoltura o cubierta del órgano o tejido a tratar. La PDT también es inefectiva en tumores de gran tamaño, ya que la luz no puede atravesar todo el tejido tumoral. La PDT es un tratamiento local y no puede ser utilizada para tratar cánceres metastatizados. (99,100)

Además de la PDT, otro enfoque parecido para el tratamiento del cáncer utilizando nanomedicina es la Terapia Fototérmica (o PTT por sus siglas en inglés). La PTT representa una aproximación novedosa a la eliminación de células tumorales empleando la luz y un fotosensibilizador que, incapaz de completar la reacción fotodinámica, desprende el exceso de energía absorbida en forma de calor. Al igual que en la PDT, en la PTT necesitamos de sustancias fotosensibles. Algunas de las nanopartículas con las que se ha investigado la eficacia de la PTT son nanopartículas de oro y nanotubos de carbono. (101)

La PTT es capaz de aprovechar esa incapacidad de completar la reacción fotodinámica y por tanto incapacidad de generar especies reactivas de oxígeno al decaer rápidamente la energía captada por la irradiación. Esa energía se disipa mediante un aumento en cascada de la energía cinética de las moléculas adyacentes al fotosensibilizador, produciendo un aumento de la temperatura.



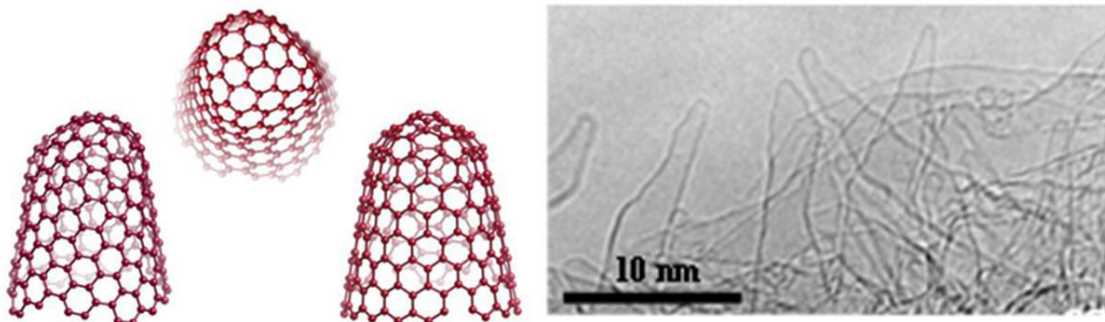
Empleando láseres de pulso de alta frecuencia se consigue hacer secuencial este fenómeno (induciendo un nuevo pico de temperatura antes de que el previo se pierda) generando una onda de choque térmico por la vaporización de las moléculas de agua. (101,102)

La PTT, al requerir irradiaciones en la longitud de onda del rojo lejano y del infrarrojo, presenta mayor capacidad de penetración en los tejidos que la PDT (con irradiaciones en el espectro visible). Por último, la PTT es totalmente independiente del oxígeno, lo que elimina la principal desventaja de la PDT en el tratamiento de tumores sólidos de un tamaño relevante. (101,102)

En el uso de la PTT, se ha demostrado que se puede funcionalizar nanotubos de carbono con un anticuerpo contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico, dirigiéndose los nanotubos únicamente hacia las células neoplásicas que sobreexpresen dicho receptor. Tras aplicar una determinada irradiación electromagnética solo morían las células tumorales debido a la hipertemia, sin verse afectadas las células sanas. (103)

No solo la nanomedicina es útil en el tratamiento del cáncer, también se han desarrollado nanosistemas, como los nanocuernos (figura 8), para la liberación de prednisolona en otros tratamientos como el de la artritis. Los nanocuernos son elementos compuestos por una pared única de átomos de carbono con estructura cónica o tubular. Recibe ese nombre porque su forma no es constante a lo largo de su eje, como en un nanotubo, si no que en uno de los extremos se cierra en una forma cónica.

El tratamiento de la artritis, como ya hemos mencionado se basa en corticoides. Estos tienen una función antiinflamatoria muy efectiva en el tratamiento de la artritis, sin embargo, sus efectos secundarios hacen que tengamos que extremar la precaución en su uso. Al unir la prednisolona a un nanocuerno se evita estos efectos secundarios indeseados. Además, se comparó en un estudio con ratas el efecto de la prednisolona unida al cuerno con la prednisolona utilizada sola y se demostró que la prednisolona unida al nanocuerno disminuía más los niveles de PCR y la leucocitosis (ambos utilizados como marcados de la inflamación en la artritis). La conclusión a la que se llegó es que con los nanocuernos con prednisolona se podía tratar de manera más eficaz la enfermedad evitando además los efectos secundarios de los corticoides. (104)



**Figura 8:** Izquierda: Representación de los nanocuernos. Derecha: nanocuernos vistos al microscopio electrónico. (105)

Además de ser útil para el tratamiento de enfermedades, también hay aplicaciones de la nanomedicina para el diagnóstico. Gracias al uso de la nanomedicina en el diagnóstico seremos capaces de llegar a este precozmente para poder tener una mayor tasa de curación. (106)

Una de las utilidades de los nanomateriales en el diagnóstico sería como métodos de contraste. Por ejemplo, se han empleado en ratones nanotubos de carbono como radiotrazadores para la tomografía de emisión de positrones.

Además de como métodos de contraste se pueden utilizar nanomateriales para detección de determinados compuestos. Dado que los nanotubos tienen una gran superficie, se les puede anexar químicamente antígenos o anticuerpos dirigidos contra moléculas o proteínas implicadas en diversas patologías. Son capaces de detectar células cancerosas en estadios precoces (107) o determinadas sustancias asociadas a enfermedades, como el antígeno prostático, el antígeno carcinoembrionario, el antígeno carbohidrato 19.9 o la alfa-fetoproteína. (108)

## 2. OBJETIVOS

Como se ha venido explicando en los puntos anteriores, uno de los grandes problemas en la enfermedad de Alzheimer, tanto para el diagnóstico como para el tratamiento, es que las moléculas de los fármacos o métodos de contraste lleguen al cerebro atravesando la barrera hematoencefálica y actúen de manera específica sobre la base patológica de la enfermedad, ya sea para poder identificar los substratos patológicos que producen el Alzheimer de forma más temprana y efectiva o para que los fármacos administrados por vía sistémica, puedan acceder al interior del cerebro y poder así actuar sobre dichos substratos para parar la evolución de la enfermedad o para poder mejorar las condiciones de vida de los pacientes que la sufren.

Es por ello que desde hace años se ha postulado como una posible solución a este tipo de problemas el uso de nanopartículas para poder transportar diferentes moléculas hacia el cerebro, superando las limitaciones que presenta la barrera hematoencefálica, ya sean para tratar o diagnosticar al paciente de manera más eficaz.

Por tanto, el objetivo de esta revisión bibliográfica es mostrar las características de dichas nanopartículas, presentándolas en diferentes subtipos en base a sus principales características físicas y exponer su eficacia, comparándolas con los fármacos y los métodos diagnósticos actuales. También se analizará entre las distintas nanopartículas cual es más eficaz y que vía de administración es más favorable para que la concentración de las mismas en el cerebro sea mayor.

### 3. METODOLOGÍA

Se ha realizado una búsqueda de artículos en distintas bases de datos (PubMed, UpToDate y Google Académico) relacionados con la enfermedad de Alzheimer y el uso de nanopartículas en la misma. También se utilizaron informes del Instituto Nacional de Estadística para recabar los datos de la prevalencia y la mortalidad de la enfermedad en nuestro país.

En dichas bases de datos se llevó a cabo la búsqueda de artículos mediante diferentes palabras clave, tanto en castellano como en inglés, las cuales se combinaron entre sí mediante la conjunción “y” (o “and” en idioma ingles):

- Enfermedad de Alzheimer (*Alzheimer's Disease*).
- Nanosistemas (*Nanosystems*).
- Nanopartículas (*Nanoparticles*).
- Nanomedicina (*Nanomedicine*).
- Nanofármacos (*Nanodrugs*).
- Barrera Hematoencefálica (*Blood Brain Barrier*).
- Neuronas (*Neurons*).
- Placas amiloides (*Amyloid plaques*).
- Ovillos neurofibrilares (*Neurofibrillary tangles*).
- Liposomas (*Liposomes*).
- Nanopartículas poliméricas (*Polimeric Nanoparticles*).
- Nanopartículas de oro (*Gold Nanoparticles*).
- Transporte de fármacos (*Drug Delivery*).

Una vez finalizada la búsqueda se desecharon los documentos que no guardaban relación con el tema tratado en esta revisión o cuya información no fue considerada relevante, los publicados con más de 25 años de antigüedad y los que estuvieran publicados en otro idioma diferente al castellano o al inglés.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 INTRODUCCIÓN A LAS NANOPARTÍCULAS

Las nanopartículas se definen como partículas sólidas o dispersiones de partículas con tamaños que oscilan entre 1 y 100 nanómetros.

Las nanopartículas han sido propuestas como las herramientas que pueden resolver el problema de mejorar los transportes de fármacos desde la sangre al cerebro, en particular mediante la funcionalización de su superficie con agentes que permitan el cruce de la barrera hematoencefálica. Los liposomas, las nanopartículas de lípidos sólidos, las nanopartículas poliméricas y las nanopartículas de oro son las nanopartículas más estudiadas para la administración de fármacos al cerebro, debido a sus características comunes de biocompatibilidad, estabilidad, biodegradabilidad, no toxicidad, antigenicidad limitada y aptitud para la funcionalización de la superficie.

Las nanopartículas adecuadas para el cruce de la barrera hematoencefálica deben tener características específicas. Por ejemplo, deben tener una vida media larga en la circulación sanguínea, ya que, después de su ingreso en la sangre, son eliminadas rápidamente por el sistema reticuloendotelial y son retiradas principalmente por el hígado y el bazo. Un gran avance en esta área fue el hallazgo de que la estabilización de la superficie de las nanopartículas con surfactantes no iónicos o macromoléculas poliméricas puede prolongar la vida media hasta 24 horas en ratones y 45 horas en humanos. (109) Con respecto al tamaño, se sugiere que las nanopartículas para la administración de fármacos en el cerebro se mantengan por debajo del diámetro de 200 nanómetros para permitir su difusión dentro del cerebro, porque se estima que en el tejido cerebral humano los espacios extracelulares tienen solo algunos poros mayores de 200 nanómetros y que más de una cuarta parte de todos los poros tienen un diámetro mayor a 100 nanómetros. (110)

El enfoque más común para mejorar el paso de las nanopartículas desde el torrente sanguíneo al cerebro es explotar los mecanismos fisiológicos de transporte existentes (explicados ya en el apartado 1.5), por ejemplo, endocitosis mediada por receptores y transcitosis mediada por adsorción, incluso aunque no entendamos completamente si estos mecanismos son alterados en la enfermedad de Alzheimer. (111)

Para lograr que las nanopartículas cargadas con fármacos crucen la barrera hematoencefálica mediante el uso de receptores o de la endocitosis mediada por adsorción, la multifuncionalización de la superficie de las nanopartículas con ligandos es fundamental. La funcionalización es la modificación de la superficie de las nanopartículas para lograr unas propiedades físicas o químicas determinadas. Existen diferentes reacciones de acoplamiento con péptidos de nanopartículas o anticuerpos, los cuales son capaces de unirse a receptores específicos en las superficies de las células de la barrera hematoencefálica.

Una funcionalización de superficie ampliamente investigada es con los ligandos que activan la endocitosis mediada por receptores. En particular, tres

receptores en la barrera hematoencefálica han recibido más atención como objetivos que median la interacción con las nanopartículas: receptor de transferrina (TfR), receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLr) y receptor de lactoferrina (LacR). (112) El principal inconveniente es que los tres receptores no se expresan exclusivamente en la barrera hematoencefálica, por lo que altas cantidades de nanopartículas, que estén diseñadas para dirigirse a estas moléculas, llegarán masivamente a otros órganos antes de llegar al cerebro. Los ligandos para TfR varían desde péptidos (113) hasta anticuerpos anti TfR. (114,115) Los ligandos para LDLr son ApoE (ligando fisiológico del receptor) o péptidos derivados de él. En un artículo de Re *et al.*, (116) se demostró que la funcionalización de una nanopartícula con el fragmento monomérico 141-150 del péptido ApoE humano (mApoE), o su dímero tándem, aumenta la permeabilidad *in vitro* a través de un modelo de barrera hematoencefálica e *in vivo* en ratones sanos. (116,117) Finalmente, la lactoferrina, el ligando endógeno para LacR fue utilizado en un estudio por otros investigadores (118) en otro estudio para aumentar las propiedades de administración cerebral de los polimerosomas de PEG-polilactida-co-glicolida en ratones. (118)

La vía que involucra a los ligandos de LDLr ha sido estudiada por un grupo de investigadores, Re *et al.*, (116) los cuales publicaron un artículo demostrando que la permeabilidad de la curcumina, la cual se cree que mejora las funciones cognitivas, a través de una monocapa de la línea de células endoteliales de cerebro de rata, aumentó después de que se presentara en nanopartículas, en concreto en liposomas funcionalizados con mApoE. (116) Otro enfoque que explota indirectamente ApoE, involucra el recubrimiento de nanopartículas con polisorbato 80. El polisorbato 80 es un surfactante sintético no iónico y es usado en la formulación de distintos fármacos. De hecho, después de la inyección en el torrente sanguíneo, las apolipoproteínas se adsorben en la superficie de las nanopartículas recubiertas con polisorbato 80. (119) A continuación, las nanopartículas recubiertas imitan la LDL natural e interactúan con su receptor en las células endoteliales capilares del cerebro, siendo endocitadas. Este enfoque también se ha utilizado para aumentar la concentración de fármacos destinados a la terapia de la enfermedad de Alzheimer. Las nanopartículas recubiertas con polisorbato 80 aumentaron la concentración cerebral de rivastigmina aproximadamente cuatro veces en comparación con el fármaco libre no presentado en nanopartículas, ambos inyectados por vía intravenosa en ratas sanas. (113) La administración oral de polisorbato 80 recubierto con ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA por sus siglas en inglés) y las nanopartículas cargadas con estradiol (que como ya hemos dicho tiene un potente efecto antioxidante) dieron como resultado niveles cerebrales significativamente más altos de la hormona después de 24 h ( $1.969 \pm 0.197$  nanogramos/gramo de tejido) en comparación con las no recubiertas ( $1.105 \pm 0.136$  nanogramos/gramo de tejido) en un modelo de enfermedad de Alzheimer en ratas. (120)

Un sistema de transporte singular al cerebro se basa en el uso de nanopartículas magnéticas, que podrían dirigirse hacia una región del cerebro específica mediante el uso de un imán aplicado externamente. En una investigación publicada por un grupo de investigadores (121) usaron micropartículas de quitosano de magnetita, que se inyectaron por vía intravenosa en ratas sanas, para administrar el inhibidor de la acetilcolinesterasa tacrina al cerebro, al mantener un imán en la región objetivo. Este sistema demostró un

aumentó más de cinco veces la concentración de tacrina en el cerebro en comparación con la droga libre. (121)

En busca de rutas alternativas para la administración de fármacos en nanopartículas dirigidas al cerebro, se ha investigado el uso de la vía nasal. Varios compuestos, tales como ciclodextrinas, fosfatidilcolinas y derivados del ácido fusídico, se han investigado como potenciadores de la absorción nasal. (122) En los puntos siguientes se incluirán diversos estudios que investigan la utilidad de la administración de fármacos por vía intranasal en la enfermedad de Alzheimer.

## 4.2 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

Las nanopartículas poliméricas son partículas sólidas con un tamaño entre 10 y 1.000 nanómetros que permiten encapsular medicamentos dentro de una matriz polimérica, protegiéndolos de la degradación enzimática e hidrolítica. (123) Las nanopartículas poliméricas pueden prepararse mediante varios métodos entre los que se incluyen nanoprecipitación, emulsión-difusión, doble emulsificación, emulsión-coacervación y recubrimiento de polímero. Las nanopartículas poliméricas ofrecen algunas ventajas para la administración de fármacos, como alta estabilidad del almacenamiento del fármaco, liberación controlada del mismo, múltiples vías de administración disponibles y duración prolongada de la acción farmacológica. Una vez que las nanopartículas poliméricas alcanzan los tejidos diana, el fármaco se puede liberar por desorción, difusión a través de la matriz polimérica del polímero o por erosión de la nanopartícula. Debido a la obvia imposibilidad de recuperar las nanopartículas, es necesario que estas sean biodegradables y desaparezcan tras la liberación total del fármaco. (124–128)

Entre los biomateriales disponibles, el Poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA) es el polímero más comúnmente utilizado para dispositivos de liberación controlada biodegradables y biocompatibles, ya que ofrece una gran versatilidad proporcionada por una adecuada selección del peso molecular del polímero, la copolimerización del mismo y la funcionalización de su superficie. El número de nanopartículas poliméricas que emplean polímeros biodegradables está creciendo y se espera que continúe haciéndolo. (124,129–131)

El transporte de fármacos a través de la barrera hematoencefálica al cerebro mediante nanopartículas poliméricas puede proporcionar una ventaja significativa sobre otras estrategias utilizadas para transportar fármacos al cerebro. (132,133) El mecanismo de transporte de las nanopartículas a través de la barrera hematoencefálica se debe a la retención de las nanopartículas en los capilares sanguíneos cerebrales en combinación con la adsorción de las nanopartículas a las paredes capilares. Estos dos mecanismos provocan un mayor gradiente de concentración, lo que aumenta el transporte a través de la capa de células endoteliales y, por lo tanto, mejora el suministro al cerebro. (134) Otra técnica, como ya hemos explicado anteriormente, es facilitar el transporte a través de la inhibición del sistema de flujo de salida utilizando polisorbato 80 como agente de recubrimiento. El uso de un surfactante para solubilizar los



lípidos de la membrana de la célula endotelial puede mejorar la permeabilidad del fármaco a través de la barrera hematoencefálica. (135,136)

En un estudio llevado a cabo por un grupo de investigadores de la India, se desarrollaron nanopartículas poliméricas de poli n-butil cianoacrilato recubiertas con polisorbato 80 que se prepararon mediante polimerización en emulsión. Dichas nanopartículas se cargaron con tacrina, un inhibidor de la acetilcolinesterasa. En los resultados de dicho estudio, se sugiere un mecanismo para el suministro de nanopartículas recubiertas del polisorbato 80 al cerebro a través de la interacción entre el recubrimiento del polisorbato 80 y las células endoteliales de los microvasos cerebrales, aumentando la concentración de la tacrina en el cerebro. En consecuencia, la dosis de tacrina para tratar el Alzheimer es menor, ya que esta se concentra de manera más efectiva en su órgano diana. (137)

En otro estudio llevado a cabo por los mismos investigadores, estos desarrollaron también nanopartículas de poli-n-butil cianoacrilato recubiertas con polisorbato 80 para el suministro en este caso de rivastigmina al cerebro para tratar la enfermedad de Alzheimer. Los estudios en animales se realizaron inyectando las nanopartículas en ratones. En este estudio, se sugiere que el mecanismo por el cual las nanopartículas penetran en el cerebro es el mismo y es la interacción entre la cubierta de polisorbato 80 y las células endoteliales de los capilares cerebrales. La concentración de rivastigmina en el cerebro fue mayor cuando se administró en forma de nanopartícula recubierta con polisorbato 80, llegando a concentraciones de 170 nanogramos/mililitro, mayores que cuando el fármaco se administra libremente o se administra mediante nanopartículas no recubiertas, lo que prueba no solo la utilidad del uso de nanopartículas, si no también de funcionalizarlas con polisorbato 80. (113)

En un estudio publicado en el año 2014, se llevó a cabo un enfoque diferente al mencionado anteriormente, ya que no solo se trató de que las nanopartículas cruzaran mejor la barrera hematoencefálica, si no también se trató de dirigir las nanopartículas a una diana concreta. Para dicho objetivo, los investigadores desarrollaron un sistema de administración con nanopartículas bifuncionales basado en un polímero pegilado de ácido poliláctico el cual contiene dos péptidos dirigidos, TGN y QSH, que se encuentran conjugados en las superficies de las nanopartículas poliméricas. TGN se dirige específicamente a los ligandos en la barrera hematoencefálica, mientras que QSH tiene una alta afinidad por el péptido beta-amiloide. Este estudio se llevó a cabo en ratones con Alzheimer. Como resultado, las nanopartículas fueron dirigidas a las placas de amiloide con precisión, concentrándose alrededor de ellas. (138)

En un estudio conducido por investigadores chinos se investigó el uso de nanopartículas intranasales para administrar el factor de crecimiento de fibroblastos básico o bFGF por sus siglas en inglés, como tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. En este estudio, bFGF fue introducido en nanopartículas conjugadas con PEG y PLGA y la lectina *Solanum tuberosum* (LST), la cual se une selectivamente a la N-acetilglucosamina presente en la membrana epitelial nasal para facilitar el paso de la nanopartícula al cerebro. Las nanopartículas se prepararon utilizando el método de evaporación con disolvente de emulsión. La administración intranasal de las nanopartículas modificadas con

LST dio como resultado una distribución de las nanopartículas en el cerebro de 1.7 a 5.17 veces mayor que la administración intravenosa de las nanopartículas. (139)

En este mismo estudio se investigó el efecto que tenía el bFGF sobre la colinacetiltransferasa. La colinacetiltransferasa o AchT, es la enzima encargada de unir la acetil-CoA a la colina, formando como resultado la acetilcolina. Se cree que esta enzima está alterada en la enfermedad de Alzheimer, por lo que un aumento en su actividad mejoraría los síntomas de la enfermedad al incrementar los niveles de acetilcolina, de forma parecida a como hacen los inhibidores de la acetilcolinesterasa, cuya función ya ha sido explicada en puntos anteriores. Al administrar las nanopartículas poliméricas cargadas con bFGF y conjugadas con LST por vía nasal la actividad de AchT en ratones mostró un aumento significativo en el grupo tratado con nanopartículas a través de la vía intranasal en comparación con el grupo de control de ratones no tratados. Estos hallazgos indicaron que la actividad de AchT en el hipocampo de los ratones con Alzheimer tratados con nanopartículas conjugadas con LST cargadas con bFGF fue mayor que en las ratones tratados con nanopartículas no conjugadas. Las nanopartículas conjugadas con LST podrían facilitar de manera efectiva el transporte directo de bFGF al cerebro de los ratones con unos efectos adversos periféricos reducidos gracias a la administración intranasal. Debido a estos resultados, en este estudio se postula que las nanopartículas de copolímero PEG-PLGA que presentan una superficie rica en PEG alrededor del núcleo de PLGA son ideales para la administración intranasal de fármacos ya que se ha demostrado que la superficie rica en PEG previene la agregación de nanopartículas típicamente observada cuando las nanopartículas de PLGA que no tienen recubrimiento entran en contacto con la mucosa nasal. (139)

En una investigación llevada a cabo por investigadores franceses formularon nanopartículas poliméricas de poli-hexadecil-cianoacrilato-co-metoxipoli-etilenglicol-cianoacrilato. Estos autores investigaron los efectos de estas nanopartículas para ralentizar o interrumpir el proceso de agregación *in vitro* del péptido beta-amiloide o de sus oligómeros correspondientes por electroforesis capilar. Los experimentos de electroforesis capilar demostraron que estas nanopartículas podrían unirse al péptido beta-amiloide tanto en sus formas monoméricas como oligoméricas solubles, demostrándose por tanto que estas nanopartículas influyen en la agregación del péptido beta-amiloide. Como resultado a este experimento podemos afirmar que mediante el uso de dichas nanopartículas poliméricas se puede interrumpir el proceso de agregación del péptido beta-amiloide, lo que interrumpiría el proceso de formación de placas seniles, que como ya hemos explicado en una de las bases histopatológicas de la enfermedad de Alzheimer. (140,141)

En un estudio conducido por un investigador de India se investigó acerca de la efectividad de nanopartículas poliméricas de PLGA cargadas con rivastigmina. La administración de las nanopartículas cargadas con rivastigmina en ratones tratados con escopolamina antagonizó la amnesia inducida por la escopolamina, produciendo una mejora en la capacidad de aprendizaje y memoria de los ratones mientras que la administración de rivastigmina libre no produjo ninguna mejora notable en las capacidades de aprendizaje y memoria. El estudio postula que esto se debe a una distribución más rápida y eficaz de la rivastigmina en el

cerebro cuando se conjuga con nanopartículas en comparación con la administración de rivastigmina intravenosa libre, por lo que las nanopartículas son métodos de transporte efectivos para la rivastigmina en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. (142)

En un trabajo publicado en el año 2012 se desarrollaron nanopartículas poliméricas de quitosano (un polisacárido) utilizando un método de gelificación iónica con el objetivo de mejorar la biodisponibilidad y la captación cerebral de rivastigmina mediante la administración intranasal de la misma. Posteriormente analizaron la concentración de rivastigmina en el cerebro respecto a la sangre periférica, comparando la administración de rivastigmina libre intravenosa, rivastigmina libre intranasal y de las nanopartículas por vía nasal, dando como resultado una ratio de concentración de rivastigmina cerebro/sangre de 0.235, 0.790 y 1.712 respectivamente. Estos resultados sugieren que las nanopartículas poliméricas de quitosano cargadas con rivastigmina administradas por vía nasal tienen una mayor eficacia para alcanzar su objetivo y suponen un enfoque prometedor en el transporte de rivastigmina al cerebro para el tratamiento y la prevención de la enfermedad de Alzheimer. (142)

En un estudio publicado en la revista *Nanomedicine*, los investigadores utilizaron la técnica de secado por aspersión para desarrollar nanopartículas de quitosano y N-carboximetilquitosano cargados con Idebenona, una benzoquinona de estructura similar a la coenzima Q10 que actúa como antioxidante celular. Aunque los autores no estudiaron el uso de estas nanopartículas en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, los efectos beneficiosos de la Idebenona para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (143,144) y su papel como antioxidante en la progresión de la enfermedad de Alzheimer (145–147) han sido bien documentados en ensayos clínicos. Se demostró que la incorporación de Idebenona en nanopartículas de quitosano o N-carboximetilquitosano conserva la eficacia antioxidante. Las nanopartículas mostraron un aumento de diez veces en la estabilidad de la Idebenona en comparación con el fármaco libre. La Idebenona libre presenta una reactividad severa, lo que indica un potencial significativo de corrosión o irritación. Por otro lado, la incorporación de Idebenona en las nanopartículas poliméricas mostró una disminución en la reactividad del fármaco. Debido a que el quitosano y el N-carboximetilquitosano tienen propiedades mucoadhesivas, (148–151) las nanopartículas poliméricas son potenciales portadoras para la administración nasal de fármacos hidrofóbicos e irritantes como la Idebenona debido al gran efecto del primer paso hepático sobre la Idebenona después de su administración oral que reduce considerablemente su biodisponibilidad. (152)

El tinte fluorescente Tioflavina-T es uno de los métodos más utilizados para teñir y detectar selectivamente las fibrillas amiloides tanto *in vivo* como *in vitro*. La gran mejora en la emisión de fluorescencia obtenida al unirse a las fibrillas hace de la Tioflavina-T una herramienta particularmente poderosa y útil para la detección de amiloide. Sin embargo, la Tioflavina-T, debido a que es un compuesto hidrofílico, no puede ingresar al cerebro a través de la barrera hematoencefálica. (153) En un estudio conducido por Siegemund y sus colaboradores se investigó este hecho. Para superar la barrera hematoencefálica se cargó la Tioflavina-T en nanopartículas poliméricas de poli n-butil cianoacrilato lo cual facilitó el paso de la Tioflavina-T a través de la barrera

hematoencefálica. Como resultado se demostró que la Tioflavina-T se podía utilizar para detectar el péptido beta-amiloide gracias a la gran liberación de fluorescencia después de unirse al amiloide. (154)

### 4.3 NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS

Las nanopartículas lipídicas sólidas son típicamente esféricas, con diámetros promedio entre 10 y 1,000 nanómetros cuando se dispersan en agua. Las nanopartículas lipídicas sólidas poseen una matriz sólida de lípidos que puede solubilizar moléculas lipófilas. (155) El núcleo lipídico de la nanopartícula, que está compuesto por triglicéridos (por ejemplo, tristearina), diglicéridos (por ejemplo, behenato de glicerilo), monoglicéridos (por ejemplo, monoestearato de glicerol), ácidos grasos (por ejemplo, ácido esteárico), esteroides (p. ej., colesterol) o ceras (p. ej., palmitato de cetilo), es estabilizado mediante surfactantes o emulsionantes. (156) Aunque las nanopartículas lipídicas sólidas están formadas por una matriz lipídica, se puede producir una nueva generación de nanopartículas utilizando una mezcla de lípidos sólidos con un lípido líquido, denominados transportadores de lípidos nanoestructurados, para minimizar la expulsión de fármaco asociada a las nanopartículas lipídicas sólidas. (155,157)

La barrera hematoencefálica se puede superar mediante el uso de nanopartículas lipídicas sólidas o transportadores de lípidos nanoestructurados para el suministro de medicamentos al cerebro, ya que estas formulaciones pueden penetrar en la barrera hematoencefálica o usarse por vía intranasal para evitar la barrera hematoencefálica. (158) El transporte de nanopartículas recubiertas con surfactante a través de la barrera hematoencefálica puede ocurrir a través de la endocitosis mediada por las células endoteliales de los capilares del cerebro. (159)

En un estudio publicado en *Alzheimer's and Dementia*, los investigadores desarrollaron transportadores de lípidos nanoestructurados cargados con curcumina y donepezil para su administración al cerebro a través de la vía intranasal. Los resultados demostraron una mayor concentración de fármacos en el cerebro a través de la administración intranasal en comparación con la administración intravenosa. En ratones se mostró una mejoría en la memoria y el aprendizaje en comparación con el grupo tratado con el fármaco libre. Los niveles de acetilcolina mejoraron y el daño por oxidación se redujo en los grupos tratados con transportadores de lípidos nanoestructurados. (160)

En otro estudio, conducido por Zhuang y sus colaboradores formularon transportadores de lípidos nanoestructurados cargados con vinpocetina utilizando un método de homogeneización a alta presión para mejorar la biodisponibilidad oral. Los estudios farmacocinéticos mostraron que se duplicó, se triplicó y hubo una disminución de 0,35 veces en la concentración máxima, el tiempo máximo y la constante de eliminación en plasma, respectivamente, en relación con una suspensión de vinpocetina libre. Los autores concluyeron que los transportadores de lípidos nanoestructurados mostraron una biodisponibilidad relativa del fármaco del 322% en ratones después de la administración oral en comparación con la administración del fármaco libre en

suspensión, lo que demuestra que estos transportadores de lípidos nanoestructurados se pueden usar para transportar fármacos poco solubles en agua. (161)

En otro estudio, llevado a cabo por investigadores brasileños, se desarrollaron transportadores de lípidos nanoestructurados con núcleos con base de aceite cargados con resveratrol (el cual es eficaz evitando la muerte celular en la enfermedad de Alzheimer y por su acción neuroprotectora al atacar las placas de beta-amiloide (162)) para mejorar la biodisponibilidad cerebral del resveratrol. Los resultados mostraron concentraciones del fármaco 2.5, 6.6 y 3.4 veces mayores en el cerebro, el hígado y los riñones respectivamente, de ratones tratados con los transportadores de lípidos nanoestructurados en relación con los tratados con resveratrol libre. En este mismo estudio, los investigadores demostraron que los ratones tratados con una infusión intracerebral de péptido beta-amiloide tenían déficits de memoria que se redujeron solo con el tratamiento con transportadores de lípidos nanoestructurados cargados con resveratrol. (163)

#### 4.4 LIPOSOMAS

Los liposomas son vesículas formadas por una o más bicapas de fosfolípidos orientadas concéntricamente alrededor de un compartimiento acuoso (164) que sirven como portadores de fármacos lipófilos o hidrófilos. (165) Los liposomas pueden contener una única bicapa lipídica o múltiples bicapas alrededor del compartimiento acuoso interior y, por lo tanto, se clasifican como unilamelares y multilamelares respectivamente. (166)

Los liposomas se clasifican por su tamaño lamelar como pequeñas vesículas unilamelares con diámetros de 20 a 100 nanómetros, grandes vesículas unilamelares con diámetros que superan los 100 nanómetros, vesículas unilamelares gigantes con diámetros de hasta un micrómetro, vesículas oligolamelares con diámetros de 0,1–1 micrómetro y vesículas multilamelares con diámetros de hasta 500 nanómetros. (167)

Además de por su tamaño, los liposomas se clasifican como niosomas, transferomas, etosomas y fitosomas. Los niosomas se forman por autoensamblaje de surfactantes no iónicos en una dispersión acuosa siendo más flexibles y más estables que los liposomas, lo que reduce el flujo de fármacos en comparación con los liposomas convencionales. (168) Los transferomas son vesículas deformables compuestas por fosfolípidos que generalmente son administrados por vía transdérmica. (169) Los etosomas son liposomas convencionales o transferomas que contienen hasta un 10% de etanol, lo que produce una solubilización de medicamentos hidrófilos. (170) Los fitosomas se producen al unir componentes individuales de extractos vegetales a fosfatidilcolina. (171)

En un estudio publicado en el año 2013, los investigadores formularon liposomas de rivastigmina y liposomas modificados con el péptido de penetración celular (CPP, por sus siglas en inglés) para mejorar la distribución de rivastigmina

en el cerebro, mejorar la farmacodinámica mediante la administración intranasal y minimizar los efectos secundarios. Los resultados mostraron que las concentraciones de rivastigmina en el cerebro eran significativamente diferentes después de 8 horas, alcanzando valores de concentración más altos cuando se utilizaron liposomas modificados con CPP y liposomas no modificados en comparación con el fármaco libre. La concentración promedio de rivastigmina en el cerebro fue mayor después de la administración intranasal de liposomas modificados en comparación con los liposomas no modificados. Los autores sugirieron que los liposomas cargados con rivastigmina, especialmente los liposomas modificados con CPP, mejoran el suministro cerebral de la rivastigmina y que la administración intranasal mejora también la farmacodinámica de los liposomas. (172)

En un estudio llevado a cabo por Kumaraswamy y sus colaboradores, se demostró que se podía incluir en un liposoma un bloqueador de lámina beta, con el objetivo de prevenir la agregación del amiloide al unirse el bloqueador al péptido beta-amiloide en el cerebro. (173)

Se utilizan diferentes técnicas para hacer que los liposomas logren cruzar la barrera hematoencefálica. Estas técnicas se parecen a las explicadas en puntos anteriores y entre ellas se incluye la conjugación de fármacos y anticuerpos monoclonales contra receptores endógenos existentes en la barrera hematoencefálica, (174–176) recubrir liposomas u otras nanopartículas con polisorbato 80 (como ya se ha explicado anteriormente) o utilizar péptidos o anticuerpos contra el péptido beta-amiloide para cruzar la barrera hematoencefálica y ser dirigido al cerebro. (174,177–180)

En un estudio llevado a cabo por investigadores italianos se funcionalizaron liposomas con un péptido de penetración de células TAT modificado, lo que aumentó la permeabilidad de los liposomas con curcumina a través de la barrera hematoencefálica. (181) También se ha demostrado que la funcionalización de liposomas con anticuerpos anti receptor de la transferrina mejora la permeabilidad de los liposomas funcionalizados a través de la barrera hematoencefálica en comparación con los liposomas no funcionalizados. (115)

En un estudio publicado en el año 2014 se prepararon liposomas funcionalizados con un anticuerpo monoclonal contra el receptor de transferrina en la barrera hematoencefálica y/o con un péptido análogo de lipoproteínas contra el receptor de lipoproteínas de baja densidad en la barrera hematoencefálica también. Los principales resultados mostraron que la absorción y el transporte de liposomas a través de las células endoteliales microvasculares humanas utilizadas como modelo de barrera se vio significativamente afectada por la funcionalización con el anticuerpo monoclonal o con el péptido análogo de lipoproteínas, y que la doble funcionalización con ambos ejerció un efecto aditivo. Se confirmó que el mecanismo de transporte a través de la barrera hematoencefálica era la transcitosis de vesículas. El estudio *in vivo* se realizó en ratones, y los resultados mostraron que el anticuerpo monoclonal y la doble funcionalización aumentaron el transporte en dirección al cerebro en comparación con los liposomas no dirigidos. (182)

Otro estudio publicado exploró el uso de anticuerpos monoclonales en liposomas cargados con curcumina. Este estudio comparó la capacidad de los liposomas cargados con curcumina y la curcumina libre y mostró una alta afinidad de ambos tipos por las placas seniles en el tejido cerebral postmortem de pacientes con enfermedad de Alzheimer. Se confirmó la capacidad de ambos liposomas para retrasar la agregación del péptido beta-amiloide. Sin embargo, la funcionalización de los liposomas con el anticuerpo monoclonal mejoró significativamente el paso a través de la barrera hematoencefálica. Estos resultados demuestran el potencial de los liposomas multifuncionales para la aplicación en el tratamiento y el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer. (114)

En un estudio desarrollado por Lazar y sus colaboradores se desarrollaron liposomas conjugados con curcumina y los resultados mostraron cantidades significativas de depósitos de péptido beta-amiloide marcado con los liposomas en el tejido cerebral postmortem de pacientes con enfermedad de Alzheimer. La inyección *in vivo* en el hipocampo y en el neocórtex de ratones mostró que los liposomas conjugados con curcumina podían teñir específicamente los depósitos de péptido beta-amiloide. Por lo tanto, estas formulaciones de liposomas se pueden aplicar en el diagnóstico y la administración de fármacos dirigidos en la enfermedad de Alzheimer. (183)

Se han diseñado liposomas funcionalizados con ligandos para la administración dirigida al cerebro de galantamina. El principal resultado revelado por la microscopía confocal fue que los nanoliposomas funcionalizados con ligandos facilitaron la captación de galantamina en las células neuronales. Sin embargo, se deben realizar estudios de captación *in vivo*, así como pruebas en modelos animales con Alzheimer para demostrar la efectividad de los liposomas. (184)

Liposomas cargados con rivastigmina y rivastigmina libre fueron administrados por vía subcutánea en ratones con Alzheimer inducido por cloruro de aluminio. Ambas formulaciones mejoraron el deterioro de la memoria espacial inducida por el cloruro de aluminio, sin embargo, los liposomas demostraron un efecto superior. Además, los liposomas cargados con rivastigmina disminuyeron más la actividad de la acetilcolinesterasa en comparación con la rivastigmina libre. (185)

El suministro de liposomas al cerebro se puede lograr a través de la vía intranasal para superar la barrera hematoencefálica, o los liposomas pueden cruzar la barrera hematoencefálica mediante transporte mediante difusión libre mediada por lípidos o endocitosis mediada por lípidos. (186) En una investigación publicada en *Acta Pharmaceutica* se prepararon liposomas con rivastigmina para su administración intranasal. Los liposomas administrados por vía intranasal se compararon con el grupo de fármaco libre administrado por vía oral. Los resultados mostraron que la concentración máxima fue diez veces mayor en plasma y la vida media fue significativamente mayor en el grupo de liposomas administrados por vía intranasal en comparación con el grupo de fármacos libres administrados por vía intranasal o el grupo de medicamentos libres administrados por vía oral. (187)



En un estudio publicado en el año 2013 se prepararon niosomas de ácido fólico utilizando diferentes surfactantes no iónicos y colesterol mediante la técnica de hidratación de lípidos. El ácido fólico es una vitamina soluble en agua que presenta problemas para cruzar la barrera hematoencefálica y se ha asociado con una mejoría en la respuesta de los inhibidores de la acetilcolinesterasa en personas con Alzheimer. (188) Al presentarlo en niosomas y administrarlo por vía nasal se encontró una mejora en el transporte del mismo hacia el cerebro. (189)

## 4.5 NANOPARTÍCULAS DE ORO

Las nanopartículas de oro son una de las nanopartículas más estudiadas. El oro es un metal muy estable también a nanoescala. Es un buen conductor de electrones y tiene una fuerte respuesta cuando es excitado por un campo óptico. (190)

Una aplicación de nanopartículas de oro para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer es su uso para destruir las fibrillas y placas de amiloide que contribuyen al deterioro mental mediante un tipo de “cirugía molecular” para detener o retardar la progresión de la enfermedad sin dañar el cerebro sano. Se han realizado experimentos uniendo nanopartículas de oro a un grupo de fibrillas de amiloide, incubando la mezcla resultante durante varios días y luego exponerla a campos de microondas débiles durante varias horas. Se encontró que los niveles de energía de los campos eran seis veces más pequeños que los de los teléfonos móviles y, por lo tanto, es poco probable que dañen las células sanas. Las fibrillas se disolvieron posteriormente y permanecieron disueltas durante al menos una semana después de ser irradiadas. Esto indicó que el tratamiento no solo fue eficaz para romper las fibrillas, sino que también redujo la tendencia de las proteínas a reagregarse tras su rotura. (191)

En una investigación publicada en el año 2012, los investigadores demostraron que las nanopartículas de oro inhibían la formación de fibrillas de péptido beta-amiloide, lo que lleva a la formación de fibrillas fragmentadas y oligómeros esféricos. Este grupo demostró que las nanopartículas de oro que poseen un potencial de superficie negativo funcionaban como nanochaperonas inhibiendo la formación de fibrillas del péptido beta-amiloide, por lo tanto, podrían servir como un poderoso agente terapéutico para tratar la enfermedad de Alzheimer. (192)

Sin duda, además de por su potencial en el tratamiento, las nanopartículas de oro en la enfermedad de Alzheimer destacan por su gran utilidad como método de diagnóstico. A continuación, presentamos algunas de las principales investigaciones donde se evalúa su efectividad.

En un estudio conducido por Neely y sus colaboradores se demostró que las nanopartículas de oro recubiertas con anticuerpos anti-Tau podrían utilizarse para la detección de la proteína Tau en la enfermedad de Alzheimer, sirviendo como agente de contraste para resonancia magnética. (193)

En un estudio llevado a cabo por Sparks y sus colaboradores se desarrolló una nanopartícula de oro estabilizada por ácido lipoico y PEG. Estas nanopartículas presentaron una gran afinidad por el péptido beta-amiloide. Los resultados del experimento mostraron claramente que estas nanopartículas podían ser utilizadas como método de contraste en resonancias magnéticas para monitorizar la evolución de la enfermedad, así como la respuesta a fármacos. (194)

La proteína Tau hiperfosforilada y los ligandos derivados de péptido beta-amiloide (que son oligómeros solubles), como ya se ha explicado, son biomarcadores para la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, mediante técnicas convencionales, como ELISA, su cuantificación y detección están limitadas debido a los niveles más bajos de estos compuestos en los fluidos corporales. (195) Las nanopartículas con alta sensibilidad para estos biomarcadores pueden, por lo tanto, ser una herramienta prometedora en el diagnóstico temprano de la enfermedad de Alzheimer. Bajo estas premisas, Georganopoulou *et al.* desarrollaron un código de barras biológico ultrasensible (concentraciones subfemtomolares) basado en nanopartículas capaz de detectar biomarcadores solubles de la enfermedad de Alzheimer en el líquido cefalorraquídeo basado en un "proceso en sándwich" que involucra oligonucleótidos ("código de barras de ADN") nanopartículas de oro modificadas y micropartículas magnéticas, ambas funcionalizadas con anticuerpos monoclonales o policlonales específicos para los ligandos derivados de péptido beta-amiloide. Al mezclarse con el líquido cefalorraquídeo, adoptó una "configuración de sándwich" que consiste en nanopartícula de oro, antígeno y micropartícula magnética. (196) Este proceso dio como resultado la deshibridación del ADN de doble cadena, que se cuantificó utilizando un microarray de ADN. La detección de un antígeno/ligando derivado de péptido beta-amiloide, por este código de barras biológico, dio como resultado la liberación amplificada de ADN monocatenario, lo que aumenta la sensibilidad en 6 veces, en comparación con el ELISA convencional. (197,198)

De manera similar otros investigadores propusieron un enfoque basado en otro sistema de "sándwich" presentando un método de detección ultrasensible para el péptido beta-amiloide utilizando microscopía de efecto túnel. En este experimento, se funcionalizó una nanopartícula de oro con un anticuerpo monoclonal que presentaba una gran afinidad por el péptido beta-amiloide. El antígeno deseado (péptido beta-amiloide) fue capturado por el anticuerpo. Posteriormente, el complejo nanopartícula de oro-anticuerpo (también inmunorreactivo contra el objetivo) se hizo reaccionar con micropartículas magnéticas que condujeron a la formación de estructuras "tipo sándwich". La estructura resultante fue finalmente analizada por microscopía de efecto túnel. La densidad de superficie de las nanopartículas de oro se correlacionó bien con el número de eventos de unión antígeno-anticuerpo, y como resultado, se logró una detección de péptido beta-amiloide exitosa en concentraciones de péptido de hasta 10 femtogramos/mililitros. (199)

En un estudio publicado en el año 2008, se propuso un protocolo de detección electroquímica basado en las interacciones sacárido-proteína. Se unió ácido siálico a nanopartículas de oro mediante química de "clic" (un método para generar sustancias de forma rápida uniendo pequeñas unidades entre sí). Los

dominios de ácido siálico fueron capaces de capturar el péptido beta-amiloide, como resultado de la atracción electrostática entre la carga negativa del ácido siálico y el residuo cargado positivamente del péptido beta-amiloide. Este método permitió la detección de péptido beta-amiloide hasta concentraciones submicromolares. (200)

Por último, comentar que investigadores canadienses diseñaron inmunosensores ultrasensibles basados en nanopartículas de oro funcionalizadas con un fragmento de anticuerpo, el cual reconoce específicamente los complejos beta-amiloide. El resultado mostró una correlación lineal con la concentración de péptido beta en un rango de 9 órdenes de magnitud y aumentó el límite de detección de 10 nanogramo/mililitro a 1 femtogramo/mililitro. (201)

## 4.6 OTROS

En este apartado presentaremos otros tipos de nanopartículas, además de las principales que han sido presentadas anteriormente, y otros nanosistemas que son utilizadas en la enfermedad de Alzheimer.

### 4.6.1 TERAPIA QUELANTE

La concentración de iones metálicos en el cerebro aumenta con la edad, y esto produce efectos perjudiciales en un cerebro con enfermedad de Alzheimer. (202) Un aumento en la concentración de iones de cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) crea un estrés oxidativo que genera radicales hidroxilo tóxicos que producen una disrupción en el ADN y modifican las proteínas y los lípidos. (203) Se sabe que las placas amiloides contienen niveles elevados de  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  en comparación con el cerebro sano. Estos hallazgos han sido la base de la búsqueda de nuevos enfoques terapéuticos para la enfermedad de Alzheimer, que involucran compuestos quelantes de hierro con una neurotoxicidad limitada. (204)

Los compuestos quelantes de hierro se han incorporado recientemente en forma de nanopartículas para facilitar la penetración de la barrera hematoencefálica. (205) En una investigación publicada en el *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, se estudió la eficacia *in vitro* de la terapia quelante para el posible tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Los investigadores conjugaron el quelante del cobre D-penicilamina, con nanopartículas para revertir la precipitación del péptido beta-amiloide inducido por el cobre. Se prepararon nanopartículas a partir de microemulsiones. Las sales de sodio de 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[4-(p-maleimidofenilo) butiramida] (MPB-PE) o 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[3-(2-piridilditio) -propionato] (PDP-PE) fueron añadidas y el terminal sulfhidrido de la D-penicilamina se acopló a las nanopartículas MPB-PE o PDP-PE. Los investigadores demostraron que las nanopartículas junto con la D-penicilamina disuelven las placas en condiciones reductoras. En concentraciones equimolares, la disolución del beta-amiloide fue del 80% con ácido etilendiaminotetraacético y del 40% con D-penicilamina, pero a concentraciones más altas de D-penicilamina, la disolución fue igual de efectiva

concluyéndose que las nanopartículas con D-penicilamina tendrían un papel importante en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer a través de la quelación de  $\text{Cu}^{2+}$ . (204)

#### 4.6.2 ÁCIDO NUCLEICO DE GLICEROL

El ADN se ha utilizado para producir nanosistemas para una aplicación potencial en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. El ADN es un bloque de construcción ideal para la nanotecnología debido a su capacidad para autoensamblarse y unirse en varias formas según las leyes químicas naturales de atracción. (206–212) Un investigador (213) produjo una nanoestructura autoensamblada que comprende ácido nucleico de glicerol, un análogo sintético del ADN. La única diferencia química entre el ADN y el ácido nucleico de glicerol es la molécula de monosacárido. El ácido nucleico de glicerol utiliza el monosacárido glicerol de tres carbonos en lugar de la desoxirribosa de cinco carbonos utilizada en el ADN. El monosacárido proporciona el esqueleto químico para los polímeros de ácido nucleico, anclando una molécula de fosfato y una base nitrogenada. Las nanoestructuras del ácido nucleico de glicerol poseen propiedades adicionales que no se encuentran en el ADN, incluida la capacidad de tener actividad antiamiloides y formar estructuras de imagen especular. El ácido nucleico de glicerol es un oligonucleótido, por lo tanto, el ácido nucleico de glicerol se puede usar para inhibir la expresión de genes indeseables o para sintetizar proteínas terapéuticas que pueden desempeñar un papel vital en la administración de genes *in vivo* de los tratamientos de la enfermedad de Alzheimer. (208,212,213)

#### 4.6.3 NANOGELES

La formación de fibrillas por el péptido beta-amiloide se considera, como ya hemos explicado, un paso clave en la patología de la enfermedad de Alzheimer. La inhibición de la agregación del péptido beta-amiloide es un enfoque en auge para la terapia de la enfermedad de Alzheimer. Se han desarrollado nanogeles biocompatibles compuestos por esqueletos de polisacáridos de pululano (un polisacárido compuesto por unidades de maltotriosa) con restos de colesterol hidrófobos que funcionan como chaperonas artificiales para inhibir la formación de fibrillas de amiloide las cuales poseen marcada actividad amiloide y citotoxicidad. Los nanogeles de pululano con colesterol pueden incorporar hasta seis u ocho moléculas de beta- amiloide por partícula de nanogel e inducir un cambio en la conformación del beta-amiloide pasando de un enrollamiento aleatorio a una estructura rica en alfa hélice o rica en lámina beta. La estructura es estable durante 24 horas (a 37 °C), y la agregación de beta-amiloide puede suprimirse. Además, la disociación del nanogel causada por la adición de metil-beta-ciclodextrina liberó moléculas de beta-amiloide monoméricas. Los nanogeles pululano con colesterol modificado con grupos amino con cargas positivas en condiciones fisiológicas tienen un efecto inhibitor mayor que los nanogeles de pululano con colesterol convencionales, lo que sugiere la importancia de las interacciones electrostáticas entre los nanogeles de pululano con colesterol modificado con grupos amino con cargas positivas y el beta-amiloide para inhibir la formación de fibrillas. Los estudios *ex vivo* mostraron que los nanogeles biocompatibles de 20–30 nanómetros de diámetro pueden

prevenir la agregación de proteínas asociadas con la enfermedad de Alzheimer e inhibir la formación de fibras de beta-amiloide.

## 5. CONCLUSIONES

La enfermedad de Alzheimer es una de las enfermedades neurodegenerativas con mayor prevalencia en el mundo y como ya hemos explicado se espera que su prevalencia aumente con los años, esperando que llegue a afectar a más de 100 millones de personas a nivel mundial en el año 2050.

Es por ello que se necesitan métodos de tratamiento y de diagnosis efectivos ya que estamos ante una enfermedad que afecta enormemente a la calidad de vida de los pacientes, llegando a incapacitarlos totalmente en su fase terminal privándoles incluso de su forma de ser y de la capacidad de reconocer a sus allegados.

Las nanopartículas ofrecen un nuevo campo con grandes posibilidades, tanto para el tratamiento como para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer. En cuanto al tratamiento ofrecen diversas ventajas, la principal es que permiten cruzar de manera efectiva la barrera hematoencefálica, que es el principal obstáculo con el que se encuentran los neurofármacos. Además, el hecho de que los fármacos vayan cargados en las nanopartículas y estos no se liberen hasta su llegada al cerebro hace que se eviten efectos secundarios indeseables. También, se ha experimentado la posibilidad de administrar los fármacos por vía intranasal, lo que abre nuevas posibilidades de administración para que los fármacos accedan mejor al cerebro. Por otro lado, no debemos olvidar que las nanopartículas no solo mejoran la farmacodinámica de los fármacos ya existentes si no que abre la posibilidad a que se creen nuevos fármacos con nuevos mecanismos de acción, como disolver placas de amiloide ya existentes, mediante los cuales se pueda revertir la enfermedad de Alzheimer. Esto sería algo totalmente novedoso, ya que en la actualidad solo podemos tratar los síntomas, pero no parar la progresión de la misma.

En el campo del diagnóstico, en la actualidad llegamos al diagnóstico por la clínica y por el descubrimiento de los hallazgos histológicos patológicos de la enfermedad mediante técnicas de imagen cuando el estadio ya está avanzado. Esto hace que no podamos tener un diagnóstico temprano, que nos permita tratar al paciente desde las primeras fases de la enfermedad y poder evitar la progresión de la enfermedad. Gracias a las nanopartículas se nos ofrece la oportunidad de detectar los hallazgos patológicos de manera diferenciada. Debido a la funcionalización de las mismas podemos identificar el péptido beta-amiloide de manera específica y en concentraciones muy bajas, cuando la enfermedad todavía no ha desarrollado su clínica.

A mi modo de ver, las nanopartículas son el futuro en el tratamiento y la diagnosis de la enfermedad de Alzheimer, ya que resuelven muchos de los problemas con los que nos encontramos, mejoran los resultados de los métodos

tratamiento y diagnóstico actuales y ofrecen nuevas posibilidades en ambos campos.

## 6. AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer todo el apoyo y la ayuda prestada por el Doctor Casafont y el hecho de haberme descubierto este nuevo e interesante campo de la medicina.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Banks WA. Drug delivery to the brain in Alzheimer's disease: Consideration of the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2012;64(7):629–39. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2011.12.005>
2. Gaugler J, James B, Johnson T, Scholz K, Weuve J. 2016 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's Dement*. 2016;
3. Lopez OL, Becker JT, Wahed AS, Saxton J, Sweet RA, Wolk DA, et al. Long-term effects of the concomitant use of memantine with cholinesterase inhibition in Alzheimer disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2009;80(6):600–7.
4. (INE) IN de E. Defunciones según la Causa de Muerte (2014). *Ecdm*. 2016;2016:1–7.
5. Murphy MP, Levine H. 10.3233/Jad-2010-1221. 2010;19:311–23.
6. Racchumi G, Wang G, Iadecola C, Dyke JP, Ishii M. Transgenic Mice Overexpressing Amyloid Precursor Protein Exhibit Early Metabolic Deficits and a Pathologically Low Leptin State Associated with Hypothalamic Dysfunction in Arcuate Neuropeptide Y Neurons. *J Neurosci*. 2014;
7. Davidson B, Boudreau RL, LaFerla F, Obara B, Fedorov D, Gallego-Gomez JC, et al. Silencing of CDK5 Reduces Neurofibrillary Tangles in Transgenic Alzheimer's Mice. *J Neurosci*. 2010;
8. Eckman EA, Eckman CB. A $\beta$ -degrading enzymes: modulators of Alzheimer's disease pathogenesis and targets for therapeutic intervention. *Biochem Soc Trans*. 2005;33(5):1101.
9. Qiu WQ, Walsh DM, Ye Z, Vekrellis K, Zhang J, Podlisny MB, et al. Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid  $\beta$ - protein by degradation. *J Biol Chem*. 1998;
10. Frosch MP, Farris W, Eckman EA, Chang Y, Tanzi RE, Mansourian S, et al. Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid -

- protein, and the  $\beta$ -amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. Proc Natl Acad Sci. 2003;
11. Leissring MA, Farris W, Chang AY, Walsh DM, Wu X, Sun X, et al. Enhanced proteolysis of  $\beta$ -amyloid in APP transgenic mice prevents plaque formation, secondary pathology, and premature death. Neuron. 2003;
  12. Holmes C, Boche D, Wilkinson D, Yadegarfar G, Hopkins V, Bayer A, et al. Long-term effects of A $\beta$ 42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial. Lancet. 2008;372(9634):216–23.
  13. Boom V Der. Time course of cognitive changes. 2008;454(July).
  14. Querfurth HW, Laferla FM. Alzheimer's Disease. 2018;329–44.
  15. Collinge J, Clarke AR. A general model of prion strains and their pathogenicity. Science (80- ). 2007;318(5852):930–6.
  16. Lee VM-Y, Goedert M, Trojanowski JQ. Neurodegenerative Tauopathies. Annu Rev Neurosci. 2002;
  17. Santacruz K, Lewis J, Spires T, Paulson J, Kotilinek L, Ingelsson M, et al. Medicine: Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. Science (80- ). 2005;
  18. Oddo S, Vasilevko V, Caccamo A, Kitazawa M, Cribbs DH, LaFerla FM. Reduction of soluble A $\beta$  and tau, but not soluble A $\beta$  alone, ameliorates cognitive decline in transgenic mice with plaques and tangles. J Biol Chem. 2006;
  19. Lewis J, Dickson DW, Lin WL, Chisholm L, Corral A, Jones G, et al. Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. Science (80- ). 2001;293(5534):1487–91.
  20. Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, et al. 3xTg-AD model of Alzheimer's disease with plaques and tangles\_intracellular A $\beta$  and synaptic dysfunction.pdf. 2003;39:409–21.
  21. Götz J, Chen F, Van Dorpe J, Nitsch RM. Formation of neurofibrillary tangles in P301L tau transgenic mice induced by A $\beta$ 42 fibrils. Science (80- ). 2001;293(5534):1491–5.
  22. Shen ZX. Brain cholinesterases : II . The molecular and cellular basis of Alzheimer ' s disease. 2004;308–21.
  23. Muñoz López FJ. El péptido  $\beta$ -amiloide: mecanismos de neurotoxicidad. neuroprotección por antioxidantes y estrógenos. Rev Esp Geriatr Gerontol. 2013;36(2):109–16.
  24. Hauptmann S, Keil U, Scherping I, Bonert A, Eckert A, Müller WE. Mitochondrial dysfunction in sporadic and genetic Alzheimer's disease.



- Experimental Gerontology. 2006.
25. Reddy PH, Beal MF. Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease. *Trends Mol Med*. 2008;
  26. Caspersen C, Wang N, Yao J, Sosunov A, Chen X, Lustbader J, et al. Mitochondrial A $\beta$ : a potential focal point for neuronal metabolic dysfunction in Alzheimer's disease. *FASEB J*. 2005;
  27. Hachinski V, Iadecola C, Petersen RC, Breteler MM, Nyenhuis DL, Black SE, et al. National Institute of Neurological Disorders and Stroke-Canadian Stroke Network vascular cognitive impairment harmonization standards. *Stroke*. 2006;
  28. Wyss-Coray T, Mucke L. Inflammation in neurodegenerative disease - A double-edged sword. *Neuron*. 2002.
  29. Neuroinflammation Working Group, Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, et al. Inflammation and Alzheimer's disease Neuroinflammation. *Neurobiol Aging*. 2014;
  30. Isaacs AM, Senn DB, Yuan M, Shine JP, Yankner BA. Acceleration of amyloid  $\beta$ -peptide aggregation by physiological concentrations of calcium. *J Biol Chem*. 2006;
  31. Pierrot N, Ghisdal P, Caumont AS, Octave JN. Intraneuronal amyloid- $\beta$ 1-42 production triggered by sustained increase of cytosolic calcium concentration induces neuronal death. *J Neurochem*. 2004;
  32. LaFerla FM. Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci*. 2002;
  33. Yang Y, Mufson EJ, Herrup K. Neuronal Cell Death Is Preceded by Cell Cycle Events at All Stages of Alzheimer's Disease. *J Neurosci*. 2018;
  34. Arendt T, Mittag A, Tarnok A, Mosch B, Lenz D, Morawski M. Aneuploidy and DNA Replication in the Normal Human Brain and Alzheimer's Disease. *J Neurosci*. 2007;
  35. Kivipelto M, Helkala E, Laakso MP, Hänninen T, Hallikainen M, Alhainen K, et al. later life : longitudinal , population based study. 2001;(June):1447–51.
  36. Lu D. Reduction in Levels of 24S-Hydroxycholesterol by Statin Treatment in Patients With Alzheimer Disease. 2015;60.
  37. Bullock R, Dengiz A. Cognitive performance in patients with Alzheimer's disease receiving cholinesterase inhibitors for up to 5 years. *International Journal of Clinical Practice*. 2005.
  38. Mehta M, Adem A. New acetylcholinesterase inhibitors for alzheimer's

- disease. *Int J Alzheimers Dis*. 2012;
39. Colovic MB, Krstic DZ, Lazarevic-Pasti TD, Bondzic AM, Vasic VM. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Curr Neuropharmacol*. 2013;
  40. Jann MW, Shirley KL, Small GW. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of cholinesterase inhibitors. *Clinical Pharmacokinetics*. 2002.
  41. Watkins PB, Zimmerman HJ, Knapp MJ, Gracon SI, Lewis KW. Hepatotoxic Effects of Tacrine Administration in Patients With Alzheimer's Disease. *JAMA J Am Med Assoc*. 1994;
  42. Raina P, Santaguida P, Ismaila A, Patterson C, Cowan D, Levine M, et al. Effectiveness of cholinesterase inhibitors and memantine for treating dementia: Evidence review for a clinical practice guideline. *Annals of Internal Medicine*. 2008.
  43. Fallier-Becker P, Wolburg-Buchholz K, Noell S, Wolburg H, Mack A. Brain endothelial cells and the glio-vascular complex. *Cell Tissue Res*. 2008;335(1):75–96.
  44. Parveen S, Sahoo SK. Nanomedicine: Clinical applications of polyethylene glycol conjugated proteins and drugs. *Clin Pharmacokinet*. 2006;
  45. Orive G, Hernández RM, Gascón AR, Domínguez-Gil A, Pedraz JL. Drug delivery in biotechnology: Present and future. *Current Opinion in Biotechnology*. 2003.
  46. Ferrari M. Cancer nanotechnology: Opportunities and challenges. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(3):161–71.
  47. Holtzman DM, Mandelkow E, Selkoe DJ, Tanzi RE, Nixon R. Neurotoxicity of Amyloid  $\beta$  -Protein : Synaptic and Network Dysfunction Neurotoxicity of Amyloid  $\beta$  -Protein : 2020;
  48. Albert MS, Dekosky ST, Dickson D, Dubois B, Feldman HH, Fox NC, et al. The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer ' s disease : Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer ' s Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer ' s disease. *Alzheimer's Dement* [Internet]. 2011;7(3):270–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jalz.2011.03.008>
  49. Killiany RJ, Gomez-isla T, Moss M, Kikinis R, Sandor T, Jolesz F, et al. Use of Structural Magnetic Resonance Imaging to Predict Who Will Get Alzheimer ' s Disease. 2000;430–9.
  50. Foster NL, Minoshima S, Kuhl DE. Brain imaging in Alzheimer disease. *Alzheimer Dis*. 1999;2nd(6):67–93.
  51. Contribution O. Positron Emission Tomography Metabolic Correlates of

- Apathy in Alzheimer Disease. 2015;64(7):1015–20.
52. Mosconi L, Berti V, Glodzik L, Pupi A, Santi S De. Pre-Clinical Detection of Alzheimer ' s Disease Using FDG-PET , with or without Amyloid Imaging. 2010;20:843–54.
53. Pardridge WM. Why is the global CNS pharmaceutical market so under-penetrated? Drug Discov Today. 2002;
54. Xu L, Nirwane A, Yao Y. Basement membrane and blood–brain barrier. Stroke Vasc Neurol [Internet]. 2018 Dec 5;svn-2018-000198. Available from: <http://svn.bmj.com/content/early/2018/12/05/svn-2018-000198.abstract>
55. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. Circulation Research. 2007.
56. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. Circulation Research. 2007.
57. Peppiatt CM, Howarth C, Mobbs P, Attwell D. Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. Nature. 2006;
58. Hall CN, Reynell C, Gesslein B, Hamilton NB, Mishra A, Sutherland BA, et al. Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. Nature. 2014;
59. Gerhardt H, Wolburg H, Redies C. N-cadherin mediates pericytic-endothelial interaction during brain angiogenesis in the chicken. Dev Dyn. 2000;
60. Díaz-Flores L, Gutiérrez R, Madrid JF, Varela H, Valladares F, Acosta E, et al. Pericytes. Morphofunction, interactions and pathology in a quiescent and activated mesenchymal cell niche. Histology and Histopathology. 2009.
61. Majesky MW. Developmental basis of vascular smooth muscle diversity. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 2007.
62. Armulik A, Genové G, Betsholtz C. Pericytes: Developmental, Physiological, and Pathological Perspectives, Problems, and Promises. Developmental Cell. 2011.
63. Armulik A, Genové G, Mäe M, Nisancioglu MH, Wallgard E, Niaudet C, et al. Pericytes regulate the blood-brain barrier. Nature. 2010;
64. Daneman R, Zhou L, Kebede AA, Barres BA. Pericytes are required for blood–brain barrier integrity during embryogenesis. Nature. 2010;
65. del Zoppo GJ, Milner R, Mabuchi T, Hung S, Wang X, Koziol JA. Vascular matrix adhesion and the blood–brain barrier: Table 1. Biochem Soc Trans. 2006;

66. Sorokin L. The impact of the extracellular matrix on inflammation. *Nature Reviews Immunology*. 2010.
67. Wu C, Ivars F, Anderson P, Hallmann R, Vestweber D, Nilsson P, et al. Endothelial basement membrane laminin  $\alpha 5$  selectively inhibits T lymphocyte extravasation into the brain. *Nat Med*. 2009;
68. Abbott NJ, Rönnebeck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature Reviews Neuroscience*. 2006.
69. Noell S, Wolburg-Buchholz K, Mack AF, Beedle AM, Satz JS, Campbell KP, et al. Evidence for a role of dystroglycan regulating the membrane architecture of astroglial endfeet. *Eur J Neurosci*. 2011;
70. Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Fallier-Becker P, Noell S, Mack AF. Structure and Functions of Aquaporin-4-Based Orthogonal Arrays of Particles. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2011;
71. Attwell D, Buchan AM, Charkpak S, Lauritzen M, MacVicar BA, Newman EA. Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature*. 2010.
72. Gordon GRJ, Howarth C, Macvicar BA. Bidirectional control of arteriole diameter by astrocytes. In: *Experimental Physiology*. 2011.
73. Polfliet MM, Zwijnenburg PJ, van Furth a M, van der Poll T, Döpp E a, Renardel de Lavalette C, et al. Meningeal and perivascular macrophages of the central nervous system play a protective role during bacterial meningitis. *J Immunol*. 2001;
74. Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, et al. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* (80- ). 2010;
75. Streit W, Conde J, Fendrick S, Flanary B, Mariani C. Role of microglia in the central nervous system's immune response. *Neurol Res*. 2005;
76. Ajami B, Bennett JL, Krieger C, Tetzlaff W, Rossi FM V. Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neurosci*. 2007;
77. Persidsky Y, Ghorpade A, Rasmussen J, Limoges J, Liu XJ, Stins M, et al. Microglial and astrocyte chemokines regulate monocyte migration through the blood-brain barrier in human-immunodeficiency virus-1 encephalitis. *Am J Pathol*. 1999;
78. Hudson LC, Bragg DC, Tompkins MB, Meeker RB. Astrocytes and microglia differentially regulate trafficking of lymphocyte subsets across brain endothelial cells. *Brain Res*. 2005;
79. Pardridge WM. Blood-brain barrier delivery. *Drug Discovery Today*. 2007.
80. Patel M, Souto EB, Singh KK. Advances in brain drug targeting and

- delivery: limitations and challenges of solid lipid nanoparticles. *Expert Opin Drug Deliv.* 2013;
81. Ricci M, Blasi P, Giovagnoli S, Rossi C. Delivering Drugs to the Central Nervous System: A Medicinal Chemistry or a Pharmaceutical Technology Issue? *Curr Med Chem.* 2006;
  82. Ohtsuki S, Terasaki T. Contribution of carrier-mediated transport systems to the blood-brain barrier as a supporting and protecting interface for the brain; importance for CNS drug discovery and development. *Pharmaceutical Research.* 2007.
  83. Zlokovic B V. The Blood-Brain Barrier in Health and Chronic Neurodegenerative Disorders. *Neuron.* 2008.
  84. Bickel U, Yoshikawa T, Pardridge WM. Delivery of peptides and proteins through the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;
  85. Blasi P, Giovagnoli S, Schoubben A, Ricci M, Rossi C. Solid lipid nanoparticles for targeted brain drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2007.
  86. Smith MW, Gumbleton M. Endocytosis at the blood-brain barrier: From basic understanding to drug delivery strategies. *J Drug Target.* 2006;
  87. Lu W. Adsorptive-Mediated Brain Delivery Systems. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012;
  88. Tsuji A, Tamai I. Blood-brain. *Adv Drug Deliv Rev.* 1997;(97).
  89. Schinkel AH. P-Glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 1999.
  90. Pardridge WM. Crossing the blood-brain barrier: Are we getting it right? *Drug Discovery Today.* 2001;
  91. Friberg S, Nyström AM. Nanotechnology in the war against cancer: New arms against an old enemy - A clinical view. *Future Oncology.* 2015.
  92. Britto FM. Nanotecnología , hacia un nuevo portal científico-tecnológico. *Rev QuímicaViva.* 2012;
  93. Lollo G, Rivera-Rodriguez G, Torres D, Alonso MJ. Nanoterapias oncológicas: Aplicaciones actuales y perspectivas futuras. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia.* 2011.
  94. Jáuregui-haza ROUJ. Las nanopartículas como portadores de fármacos : características y perspectivas Nanoparticles as drug carriers : characteristics and perspectives. *CENIC Ciebcias Biológicas.* 2012;
  95. Díaz Del Castillo Rodríguez F. Introducción a los nanomateriales. *Lecturas de ingeniería* 20. 2012.

96. Solano Muñoz HJ. Grafeno, el material del futuro y sus aplicaciones médicas. Cienc y Tecnol. 2015;
97. Alcocer-Macías JJ, Cogordán Coló J. Terapia fotodinámica, una nueva modalidad de tratamiento oncológico. Neumol Cir Torax. 2000;
98. Dąbrowski JM. Reactive Oxygen Species in Photodynamic Therapy: Mechanisms of Their Generation and Potentiation. In: Advances in Inorganic Chemistry. 2017.
99. Vrouenraets MB, Visser GWM, Snow GB, Van Dongen GAMS. Basic principles, applications in oncology and improved selectivity of photodynamic therapy. Anticancer Research. 2003.
100. Capella MAM, Capella LS. A light in multidrug resistance: Photodynamic treatment of multidrug-resistant tumors. Journal of Biomedical Science. 2003.
101. Wu TT, Zhou SH. Nanoparticle-based targeted therapeutics in head-and-neck cancer. Int J Med Sci. 2015;
102. Jain S, Hirst DG, O'Sullivan JM. Gold nanoparticles as novel agents for cancer therapy. British Journal of Radiology. 2012.
103. Serpell CJ, Kostarelos K, Davis BG. Can carbon nanotubes deliver on their promise in biology? Harnessing unique properties for unparalleled applications. ACS Cent Sci. 2016;
104. Nakamura M, Tahara Y, Ikehara Y, Murakami T, Tsuchida K, Iijima S, et al. Single-walled carbon nanohorns as drug carriers: Adsorption of prednisolone and anti-inflammatory effects on arthritis. Nanotechnology. 2011;
105. NEC Corp. Carbon Nanohorns [Internet]. 2017. Available from: <http://www.nec.com/en/global/prod/cnh/>
106. Lechuga LM. Nanomedicina: ampliación de la nanotecnología en la salud. Biotecnol Apl a la Salud Humana. 2010;
107. Alam F, Naim M, Aziz M, Yadav N. Unique roles of nanotechnology in medicine and cancer-II. Indian J Cancer. 2016;
108. Andrade Guel ML, López López LI, Sáenz Galindo A. Nanotubos de carbono: Funcionalización y aplicaciones biológicas. Rev Mex Ciencias Farm. 2012;
109. Moghimi SM, Szebeni J. Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: Critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. Progress in Lipid Research. 2003.
110. Masserini M. Nanoparticles for Brain Drug Delivery. ISRN Biochem. 2013;

111. Weiss N, Miller F, Cazaubon S, Couraud PO. The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. 2009.
112. Krol S. Challenges in drug delivery to the brain: Nature is against us. *J Control Release*. 2012;
113. Wilson B, Samanta MK, Santhi K, Kumar KPS, Paramakrishnan N, Suresh B. Poly(n-butylcyanoacrylate) nanoparticles coated with polysorbate 80 for the targeted delivery of rivastigmine into the brain to treat Alzheimer's disease. *Brain Res*. 2008;1200:159–68.
114. Mourtas S, Lazar AN, Markoutsas E, Duyckaerts C, Antimisiaris SG. Multifunctional nanoliposomes with curcumin-lipid derivative and brain targeting functionality with potential applications for Alzheimer disease. *Eur J Med Chem*. 2014;
115. Salvati E, Re F, Sesana S, Cambianica I, Sancini G, Masserini M, et al. Liposomes functionalized to overcome the blood-brain barrier and to target amyloid- $\beta$  peptide: The chemical design affects the permeability across an in vitro model. *Int J Nanomedicine*. 2013;
116. Re F, Cambianica I, Zona C, Sesana S, Gregori M, Rigolio R, et al. Functionalization of liposomes with ApoE-derived peptides at different density affects cellular uptake and drug transport across a blood-brain barrier model. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med*. 2011;
117. Bana L, Minniti S, Salvati E, Sesana S, Zambelli V, Cagnotto A, et al. Liposomes bi-functionalized with phosphatidic acid and an ApoE-derived peptide affect A $\beta$  aggregation features and cross the blood-brain-barrier: Implications for therapy of Alzheimer disease. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med*. 2014;
118. Yu A, Pang Z, Lu W, Yin Q, Gao H, Jiang X. Self-assembled polymersomes conjugated with lactoferrin as novel drug carrier for brain delivery. *Pharm Res*. 2012;
119. Shamenkov D, Ramge P, Cychutek K, Kreuter J, Petrov V, Koch-Brandt C, et al. Apolipoprotein-mediated Transport of Nanoparticle-bound Drugs Across the Blood-Brain Barrier. *J Drug Target*. 2002;10(4):317–25.
120. Mittal G, Carswell H, Brett R, Currie S, Kumar MNVR. Development and evaluation of polymer nanoparticles for oral delivery of estradiol to rat brain in a model of Alzheimer's pathology. *J Control Release*. 2011;
121. Wilson B, Samanta MK, Santhi K, Sampath Kumar KP, Ramasamy M, Suresh B. Significant delivery of tacrine into the brain using magnetic chitosan microparticles for treating Alzheimer's disease. *J Neurosci Methods*. 2009;
122. Türker S, Onur E, Özer Y. Nasal route and drug delivery systems. *Pharmacy World and Science*. 2004.



123. Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 2010.
124. Onoue S, Matsui T, Kuriyama K, Ogawa K, Kojo Y, Mizumoto T, et al. Inhalable sustained-release formulation of long-acting vasoactive intestinal peptide derivative alleviates acute airway inflammation. *Peptides*. 2012;
125. Morgen M, Bloom C, Beyerinck R, Bello A, Song W, Wilkinson K, et al. Polymeric nanoparticles for increased oral bioavailability and rapid absorption using celecoxib as a model of a low-solubility, high-permeability drug. *Pharm Res*. 2012;
126. Zhang J, He C, Tang C, Yin C. Ternary polymeric nanoparticles for oral siRNA delivery. *Pharm Res*. 2013;
127. Chaturvedi K, Ganguly K, Nadagouda MN, Aminabhavi TM. Polymeric hydrogels for oral insulin delivery. *Journal of Controlled Release*. 2013.
128. Hrkach J, Von Hoff D, Ali MM, Andrianova E, Auer J, Campbell T, et al. Preclinical development and clinical translation of a PSMA-targeted docetaxel nanoparticle with a differentiated pharmacological profile. *Sci Transl Med*. 2012;
129. Pandey R, Ahmad Z, Sharma S, Khuller GK. Nano-encapsulation of azole antifungals: Potential applications to improve oral drug delivery. *Int J Pharm*. 2005;
130. Reddy LH, Murthy RS. Pharmacokinetics and biodistribution studies of Doxorubicin loaded poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles synthesized by two different techniques. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2004;
131. Onoue S, Kuriyama K, Uchida A, Mizumoto T, Yamada S. Inhalable sustained-release formulation of glucagon: In vitro amyloidogenic and inhalation properties, and in vivo absorption and bioactivity. *Pharm Res*. 2011;
132. Wohlfart S, Gelperina S, Kreuter J. Transport of drugs across the blood-brain barrier by nanoparticles. *J Control Release* [Internet]. 2012;161(2):264–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.08.017>
133. Jain KK. Nanobiotechnology-based drug delivery to the central nervous system. *Neurodegenerative Diseases*. 2007.
134. Barbu E, Molnár É, Tsibouklis J, Górecki DC. The potential for nanoparticle-based drug delivery to the brain: overcoming the blood–brain barrier. *Expert Opin Drug Deliv*. 2009;
135. Soni S, Babbar AK, Sharma RK, Banerjee T, Maitra A. Pharmacoscintigraphic evaluation of polysorbate80-coated chitosan nanoparticles for brain targeting. *Am J Drug Deliv*. 2005;

136. Gao K, Jiang X. Influence of particle size on transport of methotrexate across blood brain barrier by polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles. *Int J Pharm.* 2006;
137. Wilson B, Samanta MK, Santhi K, Kumar KPS, Paramakrishnan N, Suresh B. Targeted delivery of tacrine into the brain with polysorbate 80-coated poly(n-butylcyanoacrylate) nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm.* 2008;
138. Zhang C, Wan X, Zheng X, Shao X, Liu Q, Zhang Q, et al. Dual-functional nanoparticles targeting amyloid plaques in the brains of Alzheimer's disease mice. *Biomaterials.* 2014;
139. Zhang C, Chen J, Feng C, Shao X, Liu Q, Zhang Q, et al. Intranasal nanoparticles of basic fibroblast growth factor for brain delivery to treat Alzheimer's disease. *Int J Pharm.* 2014;
140. Brambilla D, Verpillot R, De Kimpe L, Taverna M, Le Droumaguet B, Nicolas J, et al. Nanoparticles against Alzheimer's disease: PEG-PACA nanoparticles are able to link the  $\alpha\beta$ -peptide and influence its aggregation kinetic. *J Control Release.* 2010;
141. Brambilla D, Verpillot R, Taverna M, De Kimpe L, Le Droumaguet B, Nicolas J, et al. New method based on capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection (CE-LIF) to monitor interaction between nanoparticles and the amyloid- $\beta$  peptide. *Anal Chem.* 2010;
142. Joshi SA, Chavhan SS, Sawant KK. Rivastigmine-loaded PLGA and PBCA nanoparticles: Preparation, optimization, characterization, in vitro and pharmacodynamic studies. *Eur J Pharm Biopharm.* 2010;
143. Gutzmann H, Hadler D. Sustained efficacy and safety of idebenone in the treatment of Alzheimer's disease: update on a 2-year double-blind multicentre study. In 2013.
144. Weyer G, Babej-Dölle RM, Hadler D, Hofmann S, Herrmann WM. A controlled study of 2 doses of idebenone in the treatment of alzheimer's disease. *Neuropsychobiology.* 1997;
145. Sinha M, Bhowmick P, Banerjee A, Chakrabarti S. Antioxidant role of amyloid  $\beta$  protein in cell-free and biological systems: Implication for the pathogenesis of Alzheimerdisease. *Free Radic Biol Med.* 2013;
146. Allan Butterfield D, Castegna A, Lauderback CM, Drake J. Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death. *Neurobiology of Aging.* 2002.
147. Butterfield DA, Yatin SM, Varadarajan S, Koppal T. Amyloid  $\beta$ -peptide-associated free radical oxidative stress, neurotoxicity, and Alzheimer's disease. *Methods Enzymol.* 1999;
148. Illum L. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient.

Pharmaceutical Research. 1998.

149. Smart JD. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2005.
150. Cardile V, Frasca G, Rizza L, Bonina F, Puglia C, Barge A, et al. Improved adhesion to mucosal cells of water-soluble chitosan tetraalkylammonium salts. *Int J Pharm*. 2008;
151. Henriksen I, Green KL, Smart JD, Smistad G, Karlsen J. Bioadhesion of hydrated chitosans: An in vitro and in vivo study. *Int J Pharm*. 1996;
152. Bodmer M, Vankan P, Dreier M, Kutz KW, Drewe J. Pharmacokinetics and metabolism of idebenone in healthy male subjects. *Eur J Clin Pharmacol*. 2009;
153. Klunk WE, Wang Y, Huang G feng, Debnath ML, Holt DP, Mathis CA. Uncharged thioflavin-T derivatives bind to amyloid-beta protein with high affinity and readily enter the brain. *Life Sci*. 2001;
154. Siegemund T, Paulke BR, Schmiedel H, Bordag N, Hoffmann A, Harkany T, et al. Thioflavins released from nanoparticles target fibrillar amyloid  $\beta$  in the hippocampus of APP/PS1 transgenic mice. In: *International Journal of Developmental Neuroscience*. 2006.
155. Müller RH, Radtke M, Wissing SA. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. In: *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2002.
156. Mehnert W, Mäder K. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012.
157. Pardeike J, Hommoss A, Müller RH. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *International Journal of Pharmaceutics*. 2009.
158. Martins SM, Sarmiento B, Nunes C, Lúcio M, Reis S, Ferreira DC. Brain targeting effect of camptothecin-loaded solid lipid nanoparticles in rat after intravenous administration. *Eur J Pharm Biopharm*. 2013;
159. Gulyaev AE, Gelperina SE, Skidan IN, Antropov AS, Kivman GY, Kreuter J. Significant transport of doxorubicin into the brain with polysorbate 80-coated nanoparticles. *Pharm Res*. 1999;
160. Sood S, Jain K, Gowthamarajan K. Curcumin-donepezil-loaded nanostructured lipid carriers for intranasal delivery in an Alzheimer's disease model. *Alzheimer's Dement [Internet]*. 2013;9(4):P299. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jalz.2013.05.609>
161. Zhuang CY, Li N, Wang M, Zhang XN, Pan WS, Peng JJ, et al. Preparation and characterization of vinpocetine loaded nanostructured lipid carriers (NLC) for improved oral bioavailability. *Int J Pharm*. 2010;

162. Marambaud P, Davies P, Wu Q, Zhao H, Giliberto L, Simon JE, et al. Resveratrol lowers beta-amyloid accumulation and deposition in vivo by controlling AMPK signaling. *Alzheimer's Dement.* 2010;
163. Frozza RL, Salbego C, Bernardi A, Hoppe JB, Meneghetti A, Battastini AM, et al. Incorporation of resveratrol into lipid-core nanocapsules improves its cerebral bioavailability and reduces the A $\beta$ -induced toxicity. *Alzheimer's Dement.* 2011;
164. Lasic DD. Novel applications of liposomes. *Trends in Biotechnology.* 1998.
165. Xu X, Khan MA, Burgess DJ. Predicting hydrophilic drug encapsulation inside unilamellar liposomes. *Int J Pharm.* 2012;
166. García-Jimeno S, Escribano E, Queralt J, Estelrich J. Magnetoliposomes prepared by reverse-phase followed by sequential extrusion: Characterization and possibilities in the treatment of inflammation. *Int J Pharm.* 2011;
167. Kalra J, Bally MB. Liposomes. In: *Fundamentals of Pharmaceutical Nanoscience.* 2013.
168. Kaur H, Dhiman S, Arora S. Niosomes: A novel drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research.* 2012.
169. Arora S, Lamba H, Tiwari R. Dermal delivery of drugs using different vesicular carriers: A comparative review. *Asian J Pharm.* 2013;
170. Tuitou E, Dayan N, Bergelson L, Godin B, Eliaz M. Ethosomes - Novel vesicular carriers for enhanced delivery: Characterization and skin penetration properties. *J Control Release.* 2000;
171. Saroj S, Baby DA, Sabitha M. Current trends in lipid based delivery systems and its applications in drug delivery. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research.* 2012.
172. Yang ZZ, Zhang YQ, Wang ZZ, Wu K, Lou JN, Qi XR. Enhanced brain distribution and pharmacodynamics of rivastigmine by liposomes following intranasal administration. *Int J Pharm [Internet].* 2013;452(1–2):344–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.05.009>
173. Kumaraswamy P, Sethuraman S, Krishnan UM. Liposomal delivery of a beta sheet blocker peptide for the treatment of Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement.* 2012;
174. Rocha S. Targeted Drug Delivery Across the Blood Brain Barrier in Alzheimer's Disease. *Curr Pharm Des.* 2013;
175. Schnyder A, Huwyler J. Drug transport to brain with targeted liposomes. *NeuroRx.* 2005;

176. De Rosa G, Salzano G, Caraglia M, Abbruzzese A. Nanotechnologies: A Strategy to Overcome Blood-Brain Barrier. *Curr Drug Metab.* 2011;
177. Loureiro JA, Gomes B, Coelho MAN, Do Carmo Pereira M, Rocha S. Targeting nanoparticles across the blood-brain barrier with monoclonal antibodies. *Nanomedicine.* 2014.
178. Murugan K, Choonara YE, Kumar P, Bijukumar D, du Toit LC, Pillay V. Parameters and characteristics governing cellular internalization and trans-barrier trafficking of nanostructures. *Int J Nanomedicine.* 2015;
179. Herda LM, Polo E, Kelly PM, Rocks L, Hudecz D, Dawson KA. Designing the future of nanomedicine: Current barriers to targeted brain therapeutics. *European Journal of Nanomedicine.* 2014.
180. Lai F, Fadda AM, Sinico C. Liposomes for brain delivery. *Expert Opin Drug Deliv.* 2013;
181. Sancini G. Functionalization with TAT-Peptide Enhances Blood-Brain Barrier Crossing In vitro of Nanoliposomes Carrying a Curcumin-Derivative to Bind Amyloid-B Peptide. *J Nanomed Nanotechnol.* 2013;
182. Markoutsas E, Papadia K, Giannou AD, Spella M, Cagnotto A, Salmona M, et al. Mono and dually decorated nanoliposomes for brain targeting, in vitro and in vivo studies. *Pharm Res.* 2014;
183. Lazar AN, Mourtas S, Youssef I, Parizot C, Dauphin A, Delatour B, et al. Curcumin-conjugated nanoliposomes with high affinity for A $\beta$  deposits: Possible applications to Alzheimer disease. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med.* 2013;
184. Mufamadi MS, Choonara YE, Kumar P, Modi G, Naidoo D, Van Vuuren S, et al. Ligand-functionalized nanoliposomes for targeted delivery of galantamine. *Int J Pharm.* 2013;
185. Ismail MF, Elmeshad AN, Salem NAH. Potential therapeutic effect of nanobased formulation of rivastigmine on rat model of Alzheimer's disease. *Int J Nanomedicine.* 2013;
186. Shah L, Yadav S, Amiji M. Nanotechnology for CNS delivery of bio-therapeutic agents. *Drug Delivery and Translational Research.* 2013.
187. Arumugam K, Subramanian GS, Mallayasamy SR, Averineni RK, Reddy MS, Udupa N. A study of rivastigmine liposomes for delivery into the brain through intranasal route. *Acta Pharm.* 2008;
188. Malouf R, Evans JG. Folic acid with or without vitamin B12 for the prevention and treatment of healthy elderly and demented people. *Cochrane Database of Systematic Reviews.* 2008.
189. Ravouru N, Kondreddy P, Korakanchi D, M. H. Formulation and Evaluation of Niosomal Nasal Drug Delivery System of Folic Acid for Brain Targeting.

- Curr Drug Discov Technol. 2013;
190. Nguyen M, Felidj N, Mangeney C. Looking for Synergies in Molecular Plasmonics through Hybrid Thermoresponsive Nanostructures. Chemistry of Materials. 2016.
  191. Kogan MJ, Bastus NG, Amigo R, Grillo-Bosch D, Araya E, Turiel A, et al. Nanoparticle-mediated local and remote manipulation of protein aggregation. Nano Lett. 2006;6(1):110–5.
  192. Liao YH, Chang YJ, Yoshiike Y, Chang YC, Chen YR. Negatively charged gold nanoparticles inhibit Alzheimer's amyloid- $\beta$  fibrillization, induce fibril dissociation, and mitigate neurotoxicity. Small. 2012;
  193. Neely A, Perry C, Varisli B, Singh AK, Arbnesi T, Senapati D, et al. Ultrasensitive and highly selective detection of alzheimer's disease biomarker using two-photon rayleigh scattering properties of gold nanoparticle. ACS Nano. 2009;
  194. Sparks DL. The early and ongoing experience with the cholesterol-fed rabbit as a model of Alzheimer's disease: The old, the new and the pilot. Journal of Alzheimer's Disease. 2008.
  195. Greenberg SM, Rosand J, Schneider AT, Creed Pettigrew L, Gandy SE, Rovner B, et al. A phase 2 study of tramiprosate for cerebral amyloid angiopathy. Alzheimer Dis Assoc Disord. 2006;
  196. Georganopoulou DG, Chang L, Nam JM, Thaxton CS, Mufson EJ, Klein WL, et al. Nanoparticle-based detection in cerebral spinal fluid of a soluble pathogenic biomarker for Alzheimer's disease: New insights into progressive multifocal leukoencephalopathy. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;
  197. Gauthier S, Aisen PS, Ferris SH, Saumier D, Duong A, Haine D, et al. Effect of tramiprosate in patients with mild-to-moderate Alzheimer's disease: Exploratory analyses of the MRI sub-group of the Alphase study. J Nutr Heal Aging. 2009;
  198. Saumier D, Aisen PS, Gauthier S, Vellas B, Ferris SH, Duong A, et al. Lessons learned in the use of volumetric MRI in therapeutic trials in Alzheimer's disease: The ALZHEMED<sup>TM</sup> (tramiprosate) experience. J Nutr Heal Aging. 2009;
  199. Kang DY, Lee JH, Oh BK, Choi JW. Ultra-sensitive immunosensor for  $\beta$ -amyloid (1-42) using scanning tunneling microscopy-based electrical detection. Biosens Bioelectron. 2009;
  200. Chikae M, Fukuda T, Kerman K, Idegami K, Miura Y, Tamiya E. Amyloid- $\beta$  detection with saccharide immobilized gold nanoparticle on carbon electrode. Bioelectrochemistry. 2008;
  201. Ramassamy C, Longpré F, Christen Y. Ginkgo biloba extract (EGb 761) in

- Alzheimer's disease: is there any evidence? *Curr Alzheimer Res.* 2007;
202. Liu CY, Apuzzo MLJ, Tirrell DA, Langmoen IA, Svensson M, Berger MS, et al. Engineering of the extracellular matrix: Working toward neural stem cell programming and neurorestoration - Concept and progress report. *Neurosurgery.* 2003;
  203. Lovell MA, Robertson JD, Teesdale WJ, Campbell JL, Markesbery WR. Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *J Neurol Sci.* 1998;
  204. Cui Z, Lockman PR, Atwood CS, Hsu CH, Gupte A, Allen DD, et al. Novel D-penicillamine carrying nanoparticles for metal chelation therapy in Alzheimer's and other CNS diseases. *Eur J Pharm Biopharm.* 2005;
  205. Mandel SA, Amit T, Machluf M, Youdim MBH. Nanoparticles: A step forward for iron chelation in the brain. *Future Neurol.* 2007;
  206. Yan H, Park SH, Finkelstein G, Reif JH, LaBean TH. DNA-templated self-assembly of protein arrays and highly conductive nanowires. *Science* (80- ). 2003;
  207. Ke Y, Lindsay S, Chang Y, Liu Y, Yan H. Self-assembled water-soluble nucleic acid probe tiles for label-free RNA hybridization assays. *Science* (80- ). 2008;
  208. Seeman NC. From genes to machines: DNA nanomechanical devices. *Trends in Biochemical Sciences.* 2005.
  209. Niemeyer CM. Self-assembled nanostructures based on DNA: Towards the development of nanobiotechnology. *Current Opinion in Chemical Biology.* 2000.
  210. Liu H, Gao J, Lynch SR, Saito YD, Maynard L, Kool ET. A Four-Base Paired Genetic Helix with Expanded Size. *Science* (80- ). 2003;
  211. Yang YW, Zhang S, McCullum EO, Chaput JC. Experimental evidence that GNA and TNA were not sequential polymers in the prebiotic evolution of RNA. *J Mol Evol.* 2007;
  212. Zhang RS, McCullum EO, Chaput JC. Synthesis of two mirror image 4-helix junctions derived from glycerol nucleic acid. *J Am Chem Soc.* 2008;
  213. Chaput J. GNA: DNA chemical cousin is a nanotechnology building block. *Sci Blog Sci 2* [Internet]. 2008; Available from: <http://www.scientificblogging.com/news/releases/>. Accessed 2.20.2009.